

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra parazitologie



Bc. Pavlína Vondráčková

Nová proteáza v redukováných mitochondriích *Giardia intestinalis*

Novel protease in the reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Pavel Doležal Ph.D.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.05.2012

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce Pavlovi Doležalovi za vedení diplomové práce, udělení mnoha cenných rad, naučení mnoha experimentálních postupů a rovněž za jeho trpělivost a podporu. Děkuji rovněž Míše Marcinčikové za nesčetnou pomoc a rady při realizaci pokusů. Honzovi Pyrihovi za cenné rady ohledně exprese glutaredoxinu, Zuzce Zubáčové za pomoc při výrobě preparátů *Spironucleus vortens*. Všem členům laboratoře děkuji za příjemnou pracovní atmosféru. Mé nesmírné díky patří i mé rodině a přátelům za jejich podporu.

1.	Úvod	6
2.	Literární přehled	8
2.1.	<i>Giardia intestinalis</i>	8
2.2.	Parazitičtí prvoci extrémně redukovali své mitochondrie	9
2.3.	Mitochondrie	9
2.3.1.	Transport proteinů do mitochondrie	9
2.3.2.	Vnější membrána	12
2.3.3.	Vnitřní membrána	12
2.3.4.	Mitochondriální matrix	13
2.4.	Mitochondriální procesující proteázy	13
2.4.1.	MPP (mitochondrial processing peptidase)	13
2.4.2.	IMP (inner membrane peptidase)	14
2.4.3.	MIP (mitochondrial intermediate peptidase)	14
2.5.	Hydrogenosomy	15
2.6.	Mitosomy	15
3.	Cíle práce	17
4.	Materiál a metodika	18
4.1.	Použité organismy	18
4.1.1.	<i>Giardia intestinalis</i>	18
4.1.2.	<i>Escherichia coli</i>	18
4.1.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
4.1.4.	<i>Spironucleus vortens</i>	18
4.2.	Kultivační média	19
4.2.1.	Médium TYI-S-33 (Keister, 1983) pro axenickou kultivaci <i>Giardia intestinalis</i> , kmen WB	19
4.2.2.	Médium pro kultivaci <i>E. coli</i> :	19
4.2.3.	Médium pro kultivaci <i>S. cerevisiae</i>	19
4.2.4.	Základní médium pro kultivaci <i>Spironucleus vortens</i>	20
4.3.	Antibiotika	21
4.4.	Zásobní roztoky	21
4.4.1.	Pufry pro proteinovou elektroforézu a pro imunobloting	21
4.4.2.	Pufry pro purifikaci za denaturačních podmínek	22
4.4.3.	Pufry pro purifikaci za nativních podmínek	23
4.4.4.	Zásobní roztoky pro zjišťování přítomnosti peptidázy X u <i>S. vortens</i>	23
4.4.5.	Ostatní zásobní roztoky a pufry	23
4.5.	Použité plazmidy	25
4.5.1.	Expresní plazmid pET-42b	25
4.5.2.	Plazmid pUG35	26
4.6.	Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu protilátky	27
4.6.1.	Transformace plazmidu s genem pro peptidázu X do BL21	27
4.6.2.	Exprese rekombinantního proteinu	27
4.6.3.	Vytěžení exprimovaného proteinu	27
4.6.4.	Purifikace za denaturačních podmínek	27
4.7.	Analýza proteinů	28
4.7.1.	SDS-PAGE	28
4.7.2.	Western blot (Imunobloting)	28
4.7.3.	Detekce proteinu pomocí protilátek na membráně	29
4.7.4.	Imunofluorescence – <i>Giardia intestinalis</i>	29
4.7.5.	Montování preparátu	30

4.7.6.	Fluorescenční mikroskopie	30
4.8.	Pěstování giardií	30
4.8.1.	Udržování kmene <i>Giardia intestinalis</i> , kmen WB (ATCC 30957)	30
4.8.2.	Velkoobjemové pěstování giardií	31
4.8.3.	Sklizení buněk	31
4.9.	Frakcionace	31
4.9.1.	Příprava HSP (High Speed Pelet)	31
4.9.2.	Sodium karbonátová extrakce	32
4.10.	Topologie proteinu - Protease Protection Assay	32
4.11.	Targetování do kvasinkové mitochondrie	34
4.11.1.	PCR reakce	34
4.11.2.	Miniprep – Hight Plasmid Isolation Kit	34
4.11.3.	Restrikce (Fast Digest)	35
4.11.4.	DNA elektroforéza	35
4.11.5.	Vyříznutí vzorku z gelu	35
4.11.6.	Ligace	36
4.11.7.	Transformace do buněk	36
4.11.8.	Zjištění pozitivní kolonie	36
4.11.9.	Kontrolní restrikce	36
4.11.10.	Transformace kvasinek	37
4.11.11.	Barvení kvasinek, vytvoření preparátu	38
4.12.	Zjišťování přítomnosti peptidázy X u <i>Spirotrunculus vortens</i>	38
4.12.1.	Příprava lyzátu <i>Spirotrunculus vortens</i>	38
4.12.2.	Imunofluorescence <i>Spirotrunculus vortens</i>	38
4.13.	Testování aktivity	39
4.13.1.	Cleavage assay	39
4.13.2.	Substrátová elektroforéza s želatinou (Gelatin)	41
5.	Výsledky	42
5.1.	Bioinformatická analýza sekvence	42
5.1.1.	Detekce mitosomální targetovací sekvence peptidázy X	43
5.1.2.	Topologie proteinu	46
5.2.	Exprese proteinu	47
5.2.1.	Klonování	47
5.2.2.	Indukce v bakteriích	48
5.3.	Testování protilátky	50
5.4.	Targetování do kvasinkové mitochondrie	52
5.5.	Experimentální určení topologie proteinu	52
5.5.1.	Sodium karbonátová extrakce	52
5.5.2.	Stanovení topologie proteinu - Protease protection assay	53
5.6.	Distribuce peptidázy X u <i>Spirotrunculus vortens</i>	56
5.7.	Funkce peptidázy X	57
5.7.1.	Hledání strukturní podobnosti	57
5.7.2.	Testování aktivity IMP dehydrogenázy	58
5.7.3.	Proteázová aktivita peptidázy X	59
5.7.4.	Procesující aktivita	60
6.	Diskuze	63
7.	Závěr	66
8.	Seznam použité literatury	67

1. Úvod

Klíčovou událostí v evoluci eukaryot byla transformace původního bakteriálního endosymbionta do podoby dnešní mitochondrie. Během tohoto procesu došlo postupně k přenosu genů z endosymbionta/organely do jádra hostitelské buňky nebo k jejich úplné ztrátě. Proteiny kódované jádrem hostitelské buňky jsou tak překládány na ribosomech v cytoplasmě a následně přepravovány do mitochondrií. K tomu musí být specificky zaměřené a také rozeznány jako mitochondriální substráty. Proto je velká část mitochondriálních proteinů (asi 50%, zbytek tvoří zejména membránové proteiny) syntetizována jako prekurzorové polypeptidy obsahující amfipatické N-koncové presekvence, které jsou na vnější mitochondriální membráně rozeznány specifickými receptory. Ty je následně předají k importu TOM a TIM translokázám ve vnější a vnitřní mitochondriální membráně (Schatz and Dobberstein, 1996; Pfanner and Geissler, 2001). Po úspěšném transportu proteinu dojde k odstranění presekvence za pomoci mitochondriálních peptidáz a následně může být polypeptid sbalen do své nativní konformace. Tyto procesy mají na starosti tři peptidázy – hlavní „mitochondrial processing peptidase“ (MPP), „inner membrane peptidase“ (IMP) a tzv. „mitochondrial intermediate peptidase“ (MIP) (Gakh et al., 2002).

Giardia patří do skupiny Excavata, řád Giardiida. Je celosvětově rozšířeným střevním bičíkovcem, který způsobuje onemocnění nejen u člověka, ale i u řady živočišných druhů.

Anaerobní eukaryotické organismy jako např. *G. intestinalis* redukovaly díky svému způsobu života (parasitismus a anaerobní tvorba ATP) své mitochondrie na úroveň minimalistických váčků, tzv. mitosomů, které kompletně ztratily mitochondriální genom a obsahují jen zlomek mitochondriálních proteinů. Naší laboratoři se podařilo popsat naprosto unikátní adaptaci MPP u *G. intestinalis*, která zřejmě následovala celkové zjednodušení mitochondriálních funkcí. V tomto případě došlo ke ztrátě α -podjednotky MPP, která tak pracuje jako homodimer katalytické β -podjednotky (Šmíd et al., 2008). Nedávno se nám podařilo identifikovat v mitosomech *G. intestinalis* neznámý protein (pracovně nazvaný peptidáza X), který kromě krátkého proteázového motivu není příbuzný nejen žádné z typických mitochondriálních peptidáz, ale doposud žádnému známému proteinu (Jedelský et al., 2011).

Charakterizace peptidázy X v mitosomech *G. intestinalis* byla hlavním předmětem této práce. Jejím pracovním cílem bylo stanovit přesnou lokalizaci, topologii a funkci proteinu GL50803_9296 (identifikace substrátu a rozeznávané sekvence) a její evoluční původ (jedná

se o dramatickou adaptaci již známého enzymu nebo o zcela nový typ mitochondriální proteázy?).

2. Literární přehled

2.1. *Giardia intestinalis*

Giardia patří do skupiny Excavata, řád Diplomonadida, čeleď Giardiidae. Skupina *intestinalis* parazituje u řady savců včetně člověka, zahrnuje několik morfologicky neodlišitelných genotypů zvaných asambláže (Hsu et al., 2007).

Tento mikroskopický střevní bičíkovec způsobuje průjemové onemocnění zvané giardióza. (Adam, 2001). V ČR se řadí mezi nejčastější protozoární onemocnění. Tohoto parazitického prvoka lze nalézt v duodenu a jejunu tenkého střeva obratlovců, kde dráždí střevní sliznici a významně se podílí na snížení její resorpční plochy. Pro přichycení na povrch enterocytů je na ventrální straně buňky vytvořen z mikrotubulů a lamel proteinu giardinu nepárový přísavný disk (Peattie et al., 1989; Adam, 1991).

G. intestinalis prochází během svého životního cyklu dvěmi vývojovými stádii – patogenním bičíkatým trofozoitem a infekční cystou. Trofozoiti jsou velcí okolo 12 až 15 µm. Během mitózy dochází k přestavbě jednotlivých bičíků, ty tak během dělení mění nejen svoji polohu, ale také funkci. V každé dceřinné buňce se tak nacházejí anterolaterální a kaudální páry bičíků od rodičovské buňky, zbylé bičíky si buňka sama dotvoří. Trofozoiti obsahují dvě jádra, která se nacházejí v přední části buňky (Adam, 2001).

Poměrně odolná cysta obsahuje čtyři jádra, která jsou shluklá u jednoho pólu, dále bičíkové axonémy, uložené v cystě podélně a srpkovité útržky přísavného disku. Nejčastěji se přenáší kontaminovanou vodou či potravinami. Dalším možným způsobem přenosu je však i fekálně-orální přenos, např. mezi malými dětmi nebo při sexu (Craun, 1986; Petersen et al., 1988; Meyers et al., 1977).

Ve střevě dochází k četnému dělení bičíkovců a mechanické poškozování enterocytů vede k narušení malabsorpce u dětí (Veghelyi, 1940) ale i u dospělých jedinců (Amini, 1963; Antia et al., 1966; Tewari and Tandon, 1974).

Giardie mají na svém povrchu VSP (variable surface proteins), membránově ukotvené proteiny bohaté na cystein (Adam, 2001). VSP se během infekce obměňuje, ale jeho skutečná funkce však zatím není známa.

Buňka trofozoita obsahuje 2 stejnocenná jádra, jadérko není přítomno (Adam, 2001). V cytoplasmě se nacházejí lysosomální vakuoly, glykogenové a ribosomální granule (Adam, 1991). Golgiho aparát je přítomen pouze u encystujících se trofozoitů (Reiner et al., 1990);

Konrad et al., 2010; Doležal et al., 2005). Peroxisomy a hladké endoplasmatické retikulum u giardie nenajdeme. Tento anaerobní eukaryotický organismus redukoval díky svému způsobu života (parasitismus a anaerobní tvorba ATP) své mitochondrie na úroveň minimalistických váčků, tzv. mitosomů, bez mitochondriálního genomu obsahující jen zlomek známých proteinů (Ankarklev et al., 2010).

2.2. Parazitičtí prvoci extrémně redukovali své mitochondrie

Mitochondrie je pozůstatkem bakteriálního endosymbionta, který byl eukaryotickou buňkou pohlcen před více než 1500 miliony lety (Embley and Martin, 2006). Genomické studie navrhuji, že původ mitochondrie je monofyletický a že se prvotní mitochondriální endosymbiont vyvíjel nezávisle v anaerobních a aerobních podmínkách, které již byly obývané různými eukaryotickými liniemi (van der Giezen and Tovar, 2005). Díky tomuto vznikly organely, které se od sebe liší jak geneticky, funkčně, tak morfologicky v závislosti na tom, v jakém prostředí se vyvíjely. Těmito organelami jsou klasické mitochondrie, extrémně redukované mitosomy a hydrogenosomy. Všechny tyto organely mají podobný mechanismus importu proteinů (Doležal et al., 2005).

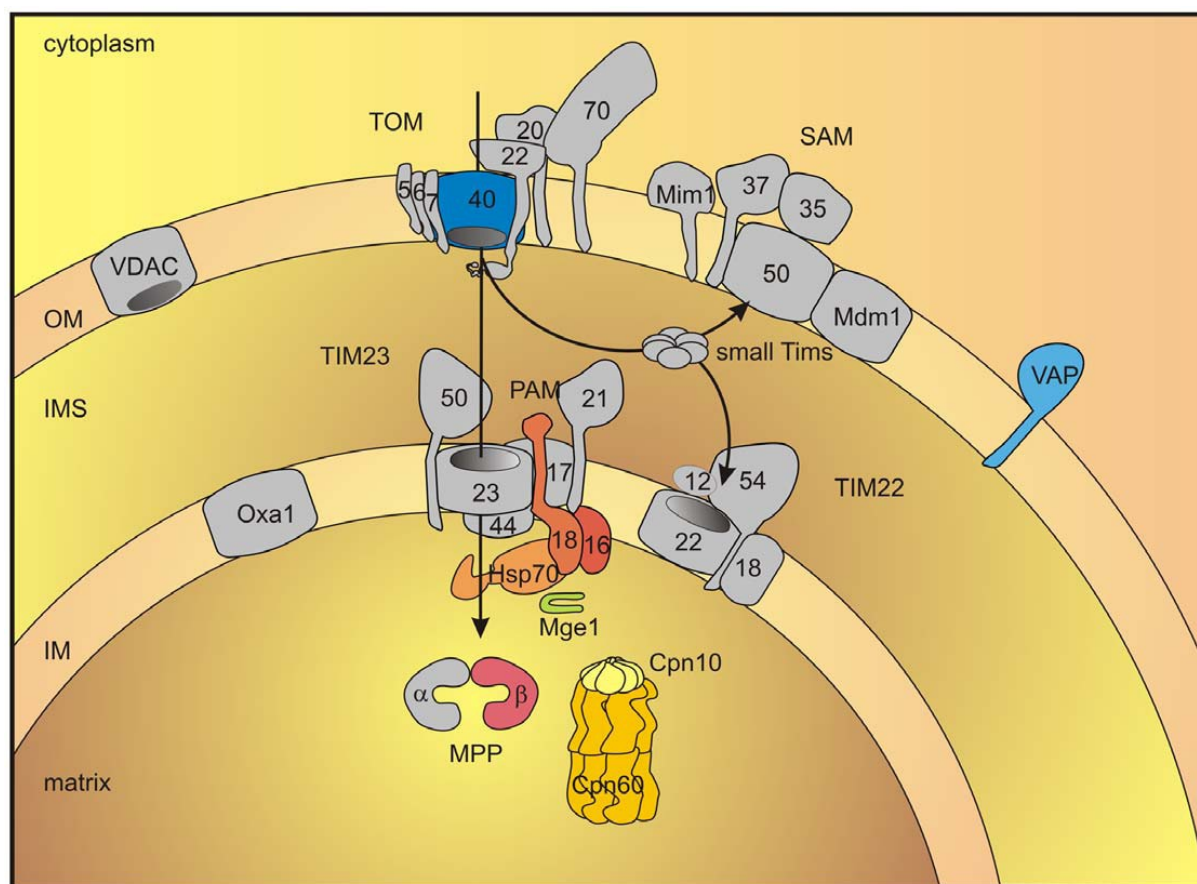
2.3. Mitochondrie

Mitochondrie je dvěma membránami obalená organela vyskytující se u všech eukaryotických buněk (Schwartz and Dayhoff, 1978). Odehrává se zde velké množství složitých a pro buňku esenciálních reakcí. Jedná se především o oxidaci pyruvátu, citrátový cyklus, elektronový transport, oxidativní fosforylaci, vznik ATP, oxidaci mastných kyselin, biosyntézu hemu a biosyntézu FeS klastrů (van der Giezen and Tovar, 2005) a v neposlední řadě je zodpovědná za apoptózu buňky (Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). Pro všechny tyto děje je důležitý transport proteinů a iontů do organely (Pfanner and Geissler, 2001).

2.3.1. Transport proteinů do mitochondrie

Mitochondrie je organela rozdělená do několika subkompartmentů. Mezi vnější a vnitřní membránou se nachází mezimembránový prostor a vnitřní membrána samotná uzavírá mitochondriální matrix. Pro každý protein procházející složitou importní mašinérií je důležité,

aby došel do pro něj specifické oblasti uvnitř organely. Většina mitochondriálních proteinů je jaderně kódována, na ribozomech jsou syntetizovány jako prekurzory a následně jsou přepravovány do mitochondrie (Hoppins and Nargang, 2004). Mitochondriální membrány obsahují specifické mašinérie pro rozpoznání, translokaci a membránové vmezeření prekurzorových proteinů (preproteinů) (Wiedemann et al., 2004), jak je patrné na **obrázku 1**.



Obrázek 1

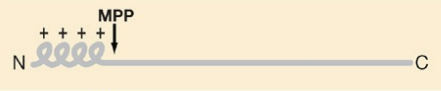

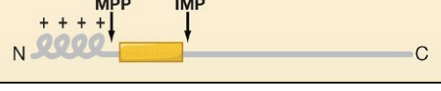
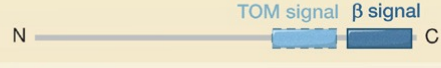



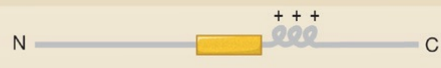
Import do mitosomů *G.intestinalis*

Komponenty nalezené v mitosomu jsou značeny barevně. Komponenty podílející se na proteinovém importu do mitochondrií zvířat a hub jsou značeny šedě. OM – vnější membrána; IMS – mezimembránový prostor; IM – vnitřní membrána; TOM – translokáza vnější membrány; SAM – sorting and assembly machinery; TIM – translokáza vnitřní membrány; PAM – presequence translocase-associated motor; VAP, VAMP (vesicle-associated membrane protein). Převzato z Jedelský et al., 2011.

Preproteiny lze nalézt v různých částech organely – jejich cílovou destinací se může stát mitochondriální matrix, vnitřní membrána, mezimembránový prostor či vnější membrána. Součástí preproteinů mířících do mitochondriální matrix je N-terminální zakončení, které nese kladný náboj, jež slouží jako targetovací signál komunikující s receptory mitochondrie

(Vassarotti et al., 1987). Díky tomuto signálu je protein schopen překročit jak vnější, tak vnitřní membránu (Roise and Schatz, 1988). Obvyklá délka mitochondriálního targetovacího signálu je od 15 do 50 aminokyselin (Chacinska et al., 2009). Dále existuje skupina preproteinů, které obsahují pouze vnitřní targetovací signál. Toto je typické pro všechny proteiny vnější membrány a dále pro některé proteiny směřující do mezimembránového prostoru, do vnitřní membrány, i do matrix mitochondrie (Chacinska et al., 2009; Koehler et al., 1999; Pfanner and Geissler, 2001). Možnosti targetování proteinů do mitochondrie jsou znázorněny na **obrázku 2**.

Možnosti targetování proteinů

Proteiny s odštěpitelným signálem		Importní místo	Lokalizace proteinu
Amfipatický α -helix Po importu presekvence odštěpena		TOM TIM23 PAM	Matrix
Presekvence + neodštěpitelný hydrofóbní úsek		TOM TIM23 (PAM)	Vnitřní membrána
Presekvence + odštěpitelný hydrofóbní úsek (bipartitní presekvence)		TOM TIM23 (PAM)	Mezimembr. prostor
Hydrofóbní proteiny s neodštěpitelným signálem			
β -signal		TOM SAM	Vnější membrána (β -barel)
Signální sekvence na N'konci		Mim1	Vnější membrána (α -helikální)
na C'konci uprostřed proteinu		? (TOM) (SAM)	
Mnohočetný vnitřní signál		TOM Tim9-Tim10 TIM22	Vnitřní membrána
Presekvence následující po hydrofóbním úseku		TOM TIM23	Vnitřní membrána

Obrázek 2

Možnosti targetování proteinů do mitochondrie

Mitochondriální prekurzorové proteiny se dělí na dvě hlavní skupiny – s odštěpitelným a s neodštěpitelným targetovacím signálem (též presekvence). K odštěpení presekvence dochází většinou v matrix mitochondrie pomocí peptidázy MPP. Pokud protein vlastní bipartitní presekvenci, dojde k odštěpení hydrofóbního úseku proteázou IMP nacházející se na vnitřní membráně. Neodštěpitelné sekvence se mohou nacházet v různých částech proteinů, jak je patrné z obrázku. Modrou barvou je znázorněn domnělý signál, který napomáhá přenosu proteinu přes TOM komplex.

Mim1 – domnělá inzertáza vnější mitochondriální membrány; PAM – presequence translocase-associated motor; SAM – sorting and assembly machinery; Tim9-Tim10 – komplex chaperonů v mezimembránovém prostoru, TIM22, TIM23 – translokáza vnitřní

membrány; TOM – translokáza vnější membrány. Převzato a upraveno z (Chacinska et al., 2009).

2.3.2. Vnější membrána

Translokázou vnější mitochondriální membrány je TOM komplex (translocase of outer mitochondrial membrane), který je vstupní branou pro všechny jaderně kódované mitochondriální proteiny (Wiedemann et al., 2004). Skládá se ze sedmi podjednotek, které zahrnují tři receptorové proteiny – Tom20, Tom22 a Tom70, dále kanál Tom40 a z malých Tom proteinů Tom5, Tom6 a Tom7 (Hill et al., 1998; Künkele et al., 1998). Presekvence preproteinů jsou nejprve rozpoznány receptorem Tom20 než jsou předány na receptor Tom22 (Wiedemann et al., 2004). Kdežto hydrofobní preproteiny s vnitřním signálem jsou rozpoznány jak dimerním receptorem Tom70, tak také částečně receptorem Tom20 (Pfanner and Geissler, 2001). Za další přenos je zodpovědný malý Tom5 protein, který předává preproteiny Tom40 kanálu (Dietmeier et al., 1997).

Všechny proteiny vnější mitochondriální membrány jsou syntetizovány v cytosolu. Většina těchto proteinů obsahuje targetovací informaci, která se může nacházet v různých částech proteinu – na N-konci, na C-konci nebo uvnitř proteinu (Pfanner and Geissler, 2001; Chacinska et al., 2009). Tyto proteiny se dělí do dvou základních skupin – α -helikální proteiny a β -barelové proteiny (Doležal et al., 2005). α -helikální proteiny jsou zakotveny v membráně jedním nebo více hydrofóbními α -helikálními úseky. Proteiny tvořící β -barely obsahují prekurzory procházející skrze TOM komplex vnější membrány do mezimembránového prostoru, odkud se skrze malé Tim proteiny dostávají do SAM komplexu ve vnější membráně, který následně integruje protein do vnější membrány (Model et al., 2001; Hoppins and Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004). β -barely mají tzv. β -signál v posledním β -listu, který je rozeznáván SAM komplexem (Kutik et al., 2008).

2.3.3. Vnitřní membrána

Většina proteinů cílených do vnitřní membrány je syntetizována bez presekvence (Wiedemann et al., 2004). Tyto prekurzorové proteiny se po překročení vnější membrány váží na Tim9-Tim10 komplex v mezimembránovém prostoru (Koehler et al., 1999; Herrmann and Neupert, 2000). Ten je dále předává do mašinerie vnitřní membrány zvané TIM22 komplex. Prekurzory jsou nyní translokovány přes klíčovou složku tohoto komplexu – přes kanál

Tim22, který je aktivován membránovým potenciálem (Sirrenberg et al., 1996; Kovermann et al., 2002).

2.3.4. Mitochondriální matrix

Rozpustné proteiny mitochondriální matrix se dostávají do kontaktu s Tim50 na vnitřní membráně, ten pak nasměruje protein do TIM23 komplexu (translocase of the inner membrane) (Truscott et al., 2001). Samotný průchod proteinu kanálem TIM23 komplexu vyžaduje přítomnost membránového potenciálu a ATP (Herrmann and Neupert, 2000). Vlastním motorem importu je PAM komplex (presequence translocase-associated motor), jehož úkolem je regulace aktivity Hsp70, který je dočasně připoután k membráně pomocí Tim44 (Matouschek et al., 2000; Neupert and Brunner, 2002). Po překonání cesty je odštěpena presekvence preproteinu pomocí MPP v mitochondriální matrix (Taylor et al., 2001).

2.4. Mitochondriální procesující proteázy

Mitochondriální procesující proteázy hrají esenciální roli v úspěšném dokončení transportu proteinů do mitochondrií, kdy se po odstranění presekvenčí polypeptid stáčí do své nativní konformace. Jsou známy tři typy peptidáz, jež nesou zodpovědnost za procesování mitochondriálních proteinů během jejich transportu do mitochondrie– MPP, IMP, MIP (Gakh et al., 2002). Tyto enzymy procesují prekuzory proteinů, které směřují do mitochondriální matrix, do vnitřní membrány, a dále do mezimembránového prostoru. Spousta prekuzorových proteinů mífících do mezimembránového prostoru obsahují dvojdiílnou presekvenčí, která je složena z targetovacího signálu pro matrix a ze signálu pro mezimembránový prostor (Gakh et al., 2002). Signál pro matrix je odštepén MPP, signál pro mezimembránový prostor pak IMP (Luciano and Géli, 1996).

2.4.1. MPP (mitochondrial processing peptidase)

Mitochondriální procesující peptidáza štěpí presekvence většiny mitochondriálních proteinů. Jedná se o heterodimerní enzym, který zřejmě vznikl na základě duplikace genu původní peptidázy bakteriálního endosymbionta. Zatímco α -podjednotka slouží k rozpoznání

substrátu, β -podjednotka nese vlastní katalytickou aktivitu komplexu. Sekvenční analýzy mitochondriálních prekursorových proteinů odhalily tři hlavní rysy většiny presekvenčí, které jsou odštěpovány MPP, jsou to – celkový pozitivní náboj, schopnost tvořit amfifilní α -helix a přítomnost argininového zbytku v -2 pozici od místa štěpení (pravidlo R-2) (Gakh et al., 2002). Zatímco u většiny eukaryot je tento enzym lokalizován v mitochondriální matrix, u rostlin je spojen s proteinovým komplexem dýchacího řetězce (Braun et al., 1995).

2.4.2. IMP (inner membrane peptidase)

Peptidáza vnitřní membrány procesuje proteiny, které se alespoň částí nacházejí v mezimembránovém prostoru. U kvasinek je tento membránově zakotvený enzym složen ze dvou podjednotek (Imp1 a Imp2), které mají katalytickou aktivitu a jsou evolučně příbuzné signálním peptidázám na bakteriální membráně a v endoplasmatickém retikulu (Nunnari et al., 1993; Schneider et al., 1994).

Peptidáza je vázána na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány do níž je ukotvena svým N-terminálním koncem, C-terminálním koncem se pak nachází v mezimembránovém prostoru. Díky podjednotce Imp1 dochází k maturaci nejméně tří proteinů: podjednotka 2 mitochondriálně kódované cytochrom c oxidázy (Cox2), prekursor jaderně kódovaného cytochromu b_2 (Cyt b_2) (Daum et al., 1982) a třetím proteinem je NADH-cytochrom b_5 reduktáza (Mcr1). Mcr1 je jaderně kódovaný protein, který se nachází ve vnější mitochondriální membráně a po štěpení Imp1 je uvolněn do mezimembránového prostoru (Haucke et al., 1997). Imp2 štěpí prekursor jaderně kódovaného cytochromu c_1 , který je nejprve rozštěpen MPP (Nunnari et al., 1993). Tato druhá podjednotka rovněž zajišťuje stabilitu a aktivitu Imp1 (Schneider et al., 1994). Nedávné studie popsaly třetí možnou podjednotku IMP, která se nazývá Som1 a nejspíš zodpovídá za správnou funkci Imp1 a štěpí Cox2 a Mcr1 substráty pro Imp1 (Jan et al., 2000).

2.4.3. MIP (mitochondrial intermediate peptidase)

Peptidáza mezimembránového prostoru byla poprvé charakterizována v mitochondriích z jater krysy (Kalousek et al., 1992). Tento enzym štěpí meziprodukty proteinů, které jsou zpracovávány MPP. MIP je odlišná od ostatních známých skupin proteáz. Díky své struktuře je řazena k nové skupině intracelulárních metalopeptidáz (Yang et al., 1991).

2.5. Hydrogenosomy

Hydrogenosomy se nacházejí u řady fylogeneticky odlišných organismů. Podobně jako mitochondrie je hydrogenosom obalen dvojitou membránou (Honigberg et al., 1984). Na rozdíl od mitochondrie však postrádá vlastní DNA, vnitřní membrána neobsahuje kristy a dále zde nebyl detekován cytochrom ani kardiolipin (Lloyd et al.; Paltauf and Meingassner, 1982). Jsou to vlastně zjednodušené anaerobní mitochondrie nacházející se nejčastěji u ciliátů obývajících bachor přežvýkavců, u hub, ale i u volně žijících nálevníků (Yarlett et al., 1981, 1986; Bruggen et al., 1984; Lloyd et al.; Paul et al., 1990; Fenchel and J Finlay, 1991; O'Fallon et al., 1991). Nejznámějším a nejvíce studovaným zástupcem, který vlastní hydrogenosomy je *Trichomonas vaginalis* ze skupiny Parabasala (Bradley et al., 1997). V hydrogenosomech probíhá metabolismus pyruvátu a jako konečné produkty vznikají acetát, CO₂ a molekulární vodík (Bui, 1996). Při tomto procesu navíc dochází ke vzniku ATP (Lahti et al., 1992). Hydrogenosomální proteiny obsahují, stejně jako ty mitochondriální, N-terminální presekvence, které jsou v organele odštěpeny od zralého proteinu hydrogenosomální procesující peptidázou, dále mají podobné složení aminokyselin. Pro import proteinů do hydrogenosomů je důležitá neporušená organela, která bude schopna udržet elektrochemický potenciál, cytosolické faktory a dále je tato reakce závislá na teplotě (optimum je 37°C) a ATP (Bradley et al., 1997).

V hydrogenosomech byly rovněž nalezeny komponenty TIM a TOM komplexu (Jedelský et al., 2011). Jedná se především o homologní komponenty importního komplexu vnitřní membrány (TIM), konkrétně Tim23, Tim17, Hsp 70 a Pam 18 (Doležal et al., 2005).

2.6. Mitosomy

Mitosomy jsou velmi zjednodušené formy mitochondrie, u kterých došlo ke ztrátě genomu a jejichž proteom je vysoce redukován – obsahuje tak jen zlomek známých proteinů (Jedelský et al., 2011). Tyto organely jsou obaleny dvěma membránami a jsou přítomny u některých jednobuněčných eukaryot, jako je například *Entamoeba histolytica* (Tovar et al., 1999; Mai et al., 1999), microsporidia *Trachipleistophora hominis* (Williams et al., 2002) a také *Giardia intestinalis* (Tovar et al., 2003). Krebsův cyklus, dýchání, ATP syntéza - funkce typické pro mitochondrie, byly ztraceny. V těchto anaerobních derivátech mitochondrie dochází pouze k biosyntéze Fe-S center, což se uskutečňuje hlavně díky cystein desulfuráze (IscS) a scaffold proteinu (IscU) (Doležal et al., 2005).

U trofozoitů giardie se nachází mitosomy jak volně rozmístěné v cytosolu, tak v oblasti mezi jejími dvěma jádry, počet těchto organel se pohybuje v rozmezí 20 až 50 (Doležal et al., 2005). Targetování proteinů do mitosomů *G. intestinalis* je svým mechanismem podobné tomu u mitochondrií (Doležal et al., 2005), nebyla však doposud objasněna podstata vlastního importu.

Dosud známými proteiny jsou homolog Tom40 (Dagley et al., 2009), Pam18 (Dagley et al., 2009) a Pam16 (Jedelský et al., 2011). Tom40 (*GiTom40*) ve vnější mitosomální membráně je 355 aminokyselin dlouhý a velký 37,8 kDa (Dagley et al., 2009) a tvoří hlavní importní pór pro targetování proteinů do organely (Jedelský et al., 2011). Oba Pam proteiny jsou součástí výše zmíněného PAM komplexu, jež na vnitřní membráně moduluje aktivitu chaperonu Hsp70.

Velikou neznámou zůstává přenos proteinů přes vnitřní mitosomální membránu. Není totiž známa translokáza zodpovědná za přítomnost membránového potenciálu ani zdroj ATP. Při targetování proteinů do mitosomální matrix dochází k odštěpování presekvenčí za účasti monomerní β -podjednotky MPP s katalytickou aktivitou, v mitosomech *G. intestinalis* totiž došlo ke ztrátě její α -podjednotky (Šmíd et al., 2008) a vlastní procesovací aktivitu zajišťuje homodimér β -podjednotky.

Dle Jedelský et al., 2011 byly v proteomu giardie potvrzeny dvě desítky proteinů s mitosomální lokalizací. Na základě mitosomální proteomické analýzy se objevilo 40 dalších, hypotetických proteinů. Mitosomální lokalizace se však potvrdila pouze u 3 proteinů – VAP (GL50803_15985), GL50803_14939 a GL50803_9296. Předmětem našeho zájmu je poslední zmíněný protein, který je zcela unikátním proteinem, jež je přítomen pouze u giardie. Tato diplomová práce je ukázkovou studií charakterizace a odhalení funkce zcela neznámého proteinu.

3. Cíle práce

V mitosomech *G.intestinalis* bylo proteomickou analýzou objeveno 5 proteinů o neznámé funkci. Hlavním cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vlastnosti a funkci proteinu GL50803_9296.

Praktické cíle:

1. Bioinformatická analýza sekvence GL50803_9296.
2. Získání rekombinantního proteinu GL50803_9296 a testování získané protilátky.
Určení topologie proteinu (protease protection assay, sodium-karbonátová extrakce).
3. Ověření funkce mitosomální/mitochondriální signální sekvence GL50803_9296 v *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Testování funkce GL50803_9296.
5. Distribuce GL50803_9296 u dalších eukaryot.

4. Materiál a metodika

4.1. Použité organismy

4.1.1. *Giardia intestinalis*

Pro většinu pokusů byli použiti trofozoiti *Giardia intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly kultivovány v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s 10% hovějším sérem (Gibco) při teplotě 37 °C.

4.1.2. *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plazmidů byl použit kmen bakterií *Escherichia coli* XL-1 blue. Transformace buněk byla prováděna tepelným šokem (42°C, 30s). Bakterie byly kultivovány při teplotě 37°C v LB médiu s přidaným ampicilinem o koncentraci 100µg/ml pro selekci pozitivních klonů.

Pro expresi proteinu za účelem výroby protilátky byly použity bakterie *E. coli* kmene BL21. Transformace i kultivace buněk byly prováděny obdobným způsobem jako u kmene XL-1 blue pouze s výjimkou použití kanamycinu pro selekci pozitivních klonů.

4.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Pro pokusy s kvasinkami byly použity buňky *Saccharomyces cerevisiae* kmene YPH499. Buňky byly kultivovány na plotnách s YPD médiem při teplotě 30°C. V případě transfekovaných linií byly buňky kultivovány v minimálním (SD) médiu bez přidaného uracilu pro selekci pozitivních klonů.

4.1.4. *Spironucleus vortens*

Pro zjištění přítomnosti proteinu GL50803_9296 u anaerobního prvoka *Spironucleus vortens* byl použit kmen ATCC 50386. Buňky byly kultivovány v základním médiu (viz níže) při teplotě 25°C s přidaným puromycinem o koncentraci 50 µg/ml.

4.2. Kultivační média

4.2.1. Médium TYI-S-33 (Keister, 1983) pro axenickou kultivaci *Giardia intestinalis*, kmen WB

V 1 litru destilované vody postupně rozpouštět navážky v pořadí:

1 g K₂HPO₄; 0,6 g KH₂PO₄; 2 g NaCl; 10 g glukózy; 10 g Yeast Extract; 20 g Trypticase Peptone – BBL; 2 g L-cysteinu; 0,2 g L-askorbové kyseliny; 1 ml citrátu železito-amonného. Po upravení pH na 6,8 pomocí NaOH, přidat 10% inaktivovaného hovězího séra (Bovine serum, Gibco) a 0,1% hovězí žluči.

Dále antibiotika – Penicilin 1000 I.U.

- Amikacin 250µg/ml

Hotové médium přefiltrovat do sterilních lahví (Filter Steritop 0,22µm, Millipore) a uchovávat v -20°C.

4.2.2. Médium pro kultivaci *E. coli*:

A. Tuhé médium

10 g LB broth (Sigma Aldrich); 500 ml dest. H₂O; 7,5 g agaru; pH 7.

B. Tekuté médium

10 g LB broth (Sigma Aldrich); 500 ml dest. H₂O; pH 7.

Sterilizovat v autoklávu 20 minut při 121 °C a tlaku 110 kPa.

4.2.3. Médium pro kultivaci *S. cerevisiae*

Minimální médium (URA3)

10 g glukózy; 6 g agaru; 0,96 g URA3, Yeast nitrogen base; 500 ml destilované vody.

Sterilizovat v autoklávu 20 minut při 121 °C a tlaku 110 kPa.

4.2.4. Základní médium pro kultivaci *Spironucleus vortens*

Pro přípravu 500 ml základního média:

Do 350 ml destilované H₂O postupně přidávat 10 g casein digest peptonu (BBL97023); 5 g yeast extraktu (BBL11928); 1 g NaCl; 5 g dextrosy; 0,5 g L-cystein HCL (SIGMA 7880); 0,01 g askorbové kyseliny.

Upravit pH na 6,8 pomocí NaOH.

Přes sterilní filtr dále 25 ml fosfátového pufru; 0,5 ml citrátu železitoamonného (22,8 mg/ml); 15 ml 10x special 107 vitamin mix; 50 ml fetal bovine serum (GIBCO) 5 ml pen/strep/fungizone.

Příprava fosfátového pufru (250 ml):

10 g K₂HPO₄; 6 g KH₂PO₄; dolít do 250 ml dH₂O.

Zásoba 10x special vitamin mix pro *S. vortens*:

Do 495 ml dH₂O přidat:

10 ml SOLN1

30 ml SOLN2

10 ml SOLN3

0,5 ml SOLN4 (1000x zásoba)

Special 107 vitamin mix stock solutions:

SOLN 1 (1 mg/ml a-lipoové kyseliny):

Rozpustit 100 mg a-lipoové kyseliny (d, L-6,8-thioctiové kyseliny (SIGMA T1395) ve 100 ml etanolu (1 mg/ml).

SOLN 2 (0,4 mg/ml vitamín B12):

Rozpustit 40 mg vitamínu B12 ve 100 ml dH₂O. (0,4 mg/ml).

SOLN 3 (Tween 80).

Rozpustit 50 g ve 100 ml etanolu.

SOLN 4: (vitamíny).

Do 800 ml dH₂O přidávat:

1,25 g choline chloridu

10 g vitamínu B12

1 ml 25 mg/ml tokoferol fosfátu.

1 ml 25 mg/ml d-biotinu
 1 ml 25 mg/ml kalciferolu
 1 ml 25 mg/ml kalcium pantotenátu
 1 ml 25 mg/ml kyseliny listové
 1 ml 12.5 mg/ml I-inositolu
 1 ml 25 mg/ml menadionu
 1 ml 62.5 mg/ml niacinu
 1 ml 62.5 mg/ml nikotinamidu
 1 ml 12.5 mg/ml p-aminobenzoové kyseliny
 1 ml 62.5 mg/ml pyridoxal hydrochloridu
 1 ml 62.5 mg/ml pyridoxin hydrochloridu
 1 ml 25 mg/ml riboflavinu
 1 ml 25 mg/ml thiamin hydrochloridu

1 ml 25 mg/ml vitaminu A (retinol).

Doplnit do objemu 1l pro vytvoření 1000x zásobního roztoku.

4.3. Antibiotika

Amikacin (Bristol-Myers Squibb).....25 mg/ml
 Ampicilin (Sigma).....100 mg/ml
 Penicilin (Biotika).....100 000 U/ml
 Kanamycin..... 25 mg/ml

4.4. Zásobní roztoky

4.4.1. Pufry pro proteinovou elektroforézu a pro imunobloting

10 x SDS pufr: 144 g glycinu; 30,3 g trizma base; 144 g SDS (dodecylsulfát sodný); rozpustit v 1000 ml dest. H₂O.

CBB barvicí roztok (Coomassie Brilliant Blue R-250): 225 ml dest. H₂O; 225 ml metanolu; 250 mg Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 ml kyseliny octové.

Odbarvovací roztok: 650 ml dest H₂O; 250 ml metanolu; 100 ml kyseliny octové.

A roztok: 30% Acrylamide/Bis Solution (Biorad).

C roztok: 9,1 g trizma base; 0,2 g SDS; rozpustit ve 100 ml dest. H₂O; pH 8,8.

D roztok: 3 g trizma base; 0,2 g SDS; rozpustit ve 100 ml dest. H₂O; pH 6,8.

G roztok: 1 g persíranu amonného; rozpustit v 10 ml dest. H₂O.

Temed: NNNN-tetra methylethylen diamine (Sigma Aldrich).

1 x SDS vzorkovací pufr: 2,4 ml D roztoku (bez SDS); 1% SDS ve 2 ml dest. H₂O; 1 ml glycerolu; 4 ml dest.H₂O; 0,1 ml bromfenolové modři; 0,5 ml merkaptetanolu.

PBS (Phosphate Buffer Saline): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,53 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; 1000 ml destilované vody, pH 7,4.

Blokovací roztok pro imunoblot: 10 g odtučněného sušeného mléka (Laktino); 100 ml PBS; pH 7,2.

Blotovací roztok pro imunoblot: 50 ml 10 x SDS pufru; 100 ml metanolu; 350 ml dest. H₂O.

Promývací pufr: 100 ml PBS; 10 g odtučněného sušeného mléka (Laktino); 500 ul Tween20 (0,5%); pH 7,2.

Blokovací roztok pro fluorescenční preparáty: Roztok PBS; 0,25% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma); 0,25% želatina (Gelatin from porcine skin Type A, Sigma, # G2500); 0,05% TWEEN.

4.4.2. Pufry pro purifikaci za denaturačních podmínek

Pufr A - 1 litr

100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris·Cl; 6 M GuHCl.

Pufrovat na pH 8.0 NaOH.

Pufr B – 1 litr

100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris·Cl; 8 M močovina.

Pufrovat na pH 8.0 NaOH.

Pufr C – 1 litr

100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris·Cl; 8 M močovina.

Pufrovat na pH 6.3 HCl.

Pufr D – 1 litr

100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris·Cl; 8 M močovina.

Pufrovat na pH 5.9 HCl.

Pufr E – 1 litr

100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris·Cl; 8 M močovina.

Pufrovat na pH 4.5 HCl.

Upravit pH před použitím při pokojové teplotě.

4.4.3. Pufry pro purifikaci za nativních podmínek

Lyzační pufr - 1 litr

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol.

Pufrovat na pH 8.0 NaOH.

Wash pufr – 1 litr

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol.

Pufrovat na pH 8.0 NaOH.

Eluční pufr – 1 litr

50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol.

Pufrovat na pH 8.0 NaOH.

4.4.4. Zásobní roztoky pro zjišťování přítomnosti peptidázy X u *S. vortens*

10% paraformaldehyd: Do 50 ml zkumavka: 2,5 g paraformaldehydu; 25 ml H₂O; 100 ul 5M KOH; zkumavku vložit na 5 minut do 90°C vodní lázně a nechat rozpustit.

2 x PEM pufr: 30,2 g PIPES (200 mM); 2 ml z 0,5 M roztoku EGTA (2 mM); 100 ul z 1 M roztoku MgSO₄ (0,2 mM); upravit pH na 6,9 pomocí konc. NaOH; dolít do 500 ml H₂O; vykládvat.

PEMBALG: 200 ml 1 x PEM pufru; 2 g BSA (1%); 0,2 g NaN₃ (0,1%); 3,6 g lysine (100mM); 1 g želatiny (0,5%) – cold water fish skin gelatin, Sigma.

4.4.5. Ostatní zásobní roztoky a pufry

Citrát železito-amonný

2,28 g žlutozelených krystalů rozpustit ve 100 ml destilované vody. Uchovávat ve 4°C.

Dnáza I

1000 U/ml (Promega).

Fyziologický roztok

9 g NaCl; 1000 ml destilované vody.

Inhibitory proteáz:

Tosyl-lysine-chloromethylketone (TLCK) 25 mg/ml; Leupeptin 5 mg/ml.

Fenyl-metyl-sulfonyl fluorid (PMSF) 1 mM.

Izopropyltiogalaktosid (IPTG)

0,1 M (Sigma).

Lysozym

10 mg/ml (Sigma).

RNáza A

10 mg/ml (Fermentas).

SOC medium

2 g trypton; 0,5 g kvasničného extraktu; 1 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄, 2 M glukóza, 100 ml destilované vody.

Lyzační pufr

20 mM Tris; 150 mM NaCl; destilovaná voda; pH 8.0.

Pufr pro cleavage assay

20 mM Tris; 0,5% Triton; 50 mM NaCl; 1 mM DTT, destilovaná voda; pH 8.0

Pufr pro měření aktivity s IMP

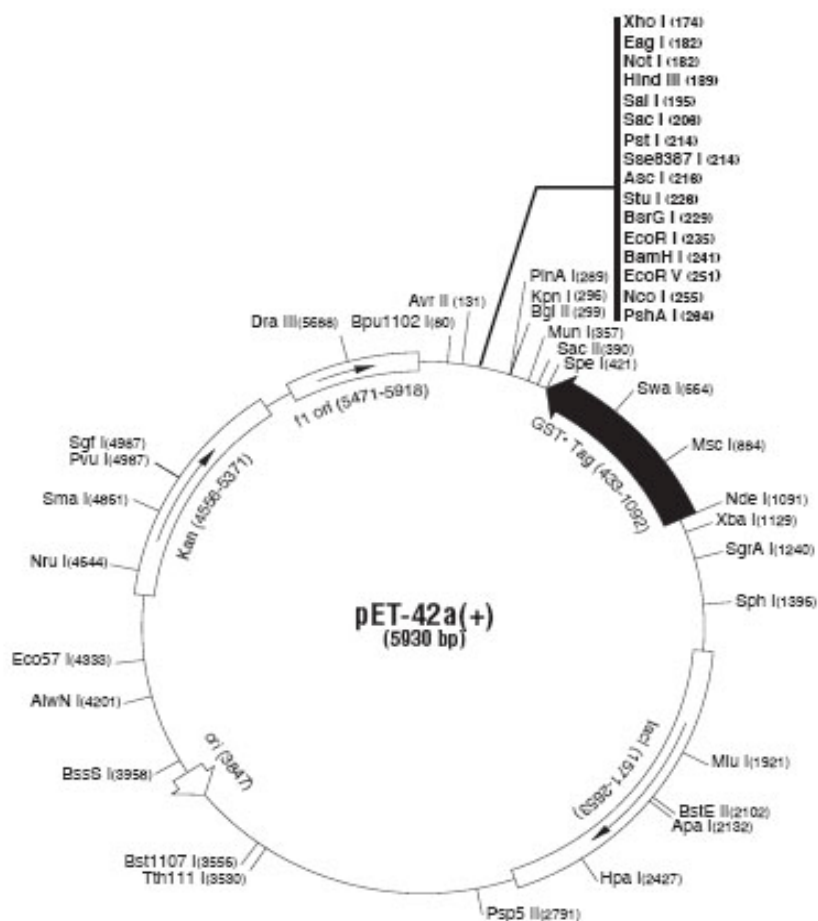
50 mM Tris; 100 mM KCl; 3 mM EDTA; 1 mM DTT ; pH 8.0.

4.5. Použité plazmidy

Pro expresi v bakteriích *E. coli* byl použit plazmid pET-42b (Novagen) vhodný k namnožení rekombinantního proteinu. Expresi proteinů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* byla provedena v plazmidu pUG35.

4.5.1. Expresní plazmid pET-42b

Jedná se o bakteriální typ plazmidu s IPTG indukovatelnou expresí obsahující gen pro resistenci ke kanamycinu. Expresi vloženého genu je řízena silným bakteriálním T7 promotorem. Jeho velikost je přibližně 5900 bp. Plazmid obsahuje 2 His tagy a GST tag.

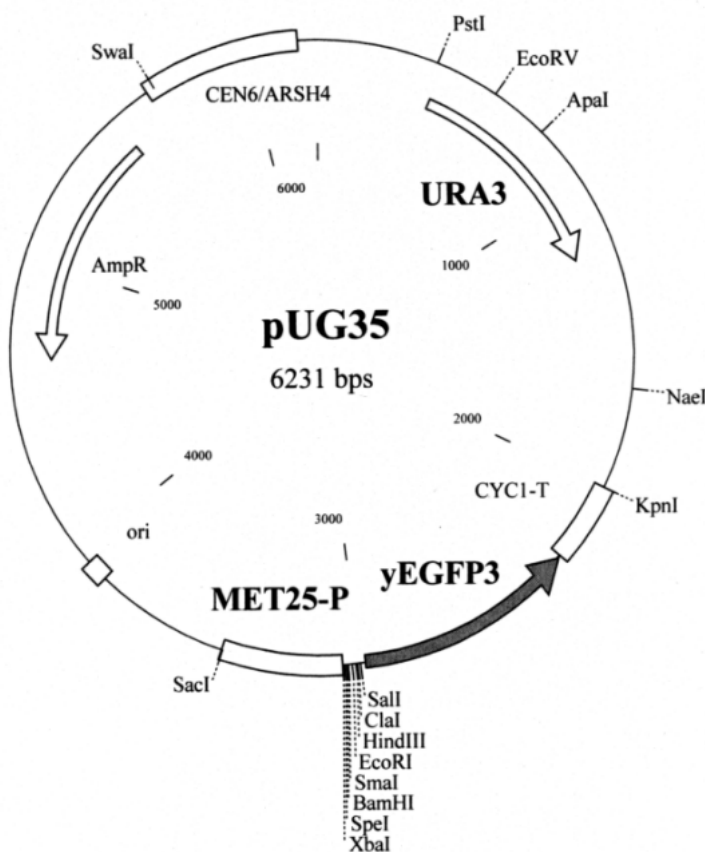


Obrázek 3

Mapa vektoru pET-42b s vyznačením restrikčních enzymů (převzato z <http://www.emdchemicals.com>).

4.5.2. Plazmid pUG35

Plazmid je odvozen od vektoru p416MET25 (Mumberg et al., 1994). Protein vložený do tohoto vektoru je na N-konci značen yEGFP3 (Yeast-enhanced green fluorescent protein) (P Cormack et al., 1997). Takto modifikovaný GFP zajišťuje silnější fluorescenční signál a je rychleji excitován. Plazmid obsahuje gen pro uracil jako selekční marker. Je veliký 6231 bp.



Obrázek 4

Mapa vektoru pUG35 s vyznačením restrikčních enzymů (převzato z <http://mips.helmholtz-muenchen.de>).

4.6. Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu protilátky

4.6.1. Transformace plazmidu s genem pro peptidázu X do BL21

Buňky a plazmid nechat rozmraznout na ledě. K buňkám přidat plazmid s genem pro peptidázu X a vzorek ponechat 20 minut na ledě. Následuje teplotní šok při teplotě 42°C po dobu 30 sekund. Přidat 250 μ l Soc média a po hodinovém třepání natřít buňky na plotnu obsahující LB médium pro kultivaci buněk BL21 a kanamycin (1 ml média/1 μ l antibiotik).

4.6.2. Exprese rekombinantního proteinu

Transformované kompetentní buňky BL21 rostly na plotnách obrácených dnem vzhůru při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byla vybraná kolonie přenesena do 50 ml tekutého LB média s kanamycinem a umístěna přes noc při 37°C v třepačce (225 otáček/min).

Další den byl vzorek přelit do 1 litru tekutého LB média s kanamycinem, po cca hodinovém třepání byla měřena optická densita (OD), kdy po dosažení hodnoty OD 0,5 přidáno IPTG (1 ml IPTG/1l LB), čímž byla indukována exprese rekombinantního proteinu. Třepat 4 hodiny.

4.6.3. Vytěžení exprimovaného proteinu

Bakterie byly stočeny při 6000 x g po dobu 10 minut při 4 °C. Vzniklý pelet byl rozsuspendován ve fyziologickém roztoku a vzorek byl přendán do 50 ml zkumavky a znovu stočen při 5000 x g po dobu 10 minut při 4 °C. Po stočení byl odsát supernatant, zbyl pelet.

4.6.4. Purifikace za denaturačních podmínek

1. K peletu přidat 5 ml B pufru a opatrně rozsuspendovat.
2. Vzniklý lyzát stočit při 6000 x g po dobu 10 minut při 4°C.
3. K supernatantu přidat 1 ml niklových kuliček a nechat 30 min kývat na ledu.
4. Zlyzované buňky nechat prokapat kolonou – Flowthrought.
5. Kolonou nechat prokapat 2 x pufr C – WASH 1 a WASH 2
6. Kolonou nechat prokapat 4 x 0,5 ml pufru D – vzorky D1, D2, D3, D4.

7. Kolonou nechat prokapat 4 x 0,5 ml pufru E – vzorky E1, E2, E3, E4.
8. Od každého vzorku vzít alikvot 40 µl a uvařit s 10 µl 5 x I.
9. SDS PAGE.

4.7. Analýza proteinů

4.7.1. SDS-PAGE

Proteiny byly separovány za denaturačních podmínek na 12% polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) dle jejich molekulové hmotnosti. Vzorky byly smíchány s 1 x SDS-PAGE vzorkovým pufrem, vařeny ve vodní lázni 3 minuty a byly naložovány na gel elektroforézy (MiniProtean II, BioRad). Molekulová hmotnost proteinu byla měřena podle standardu Sigma VII-L. Pro detekci proteinů byl gel po elektroforéze obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue R. Složení gelu je uvedeno v **tabulce 1**.

Reagencie	12% gel	Reagencie	Zaostřovací (5%) gel
Akrylamid (ml)	1,6	Akrylamid (ml)	0,24
C roztok (ml)	2	D roztok (ml)	0,75
H ₂ O (ml)	0,32	H ₂ O (ml)	0,47
Temed (ul)	5	Temed (ul)	5
G roztok (ul)	40	G roztok (ul)	20

Tabulka 1

Složky polyakrylamidového gelu.

4.7.2. Western blot (Imunobloting)

Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu v elektrickém poli.

1. Western blot následuje po gelové elektroforéze.
2. Šest kusů filtračního papíru o stejné velikosti gelu a filtrační papír ponechán 5 minut v blotovacím pufru.
3. Nitrocelulózová membrána nejprve namočená na 1 minutu do vody, poté na 5 minut do blotovacího pufru.
4. Sestaven tzv. „sendvič“ – skládány na sebe 3 kusy filtračního papíru, nitrocelulózová

membrána, gel a opět 3 kusy filtračního papíru, opatrně vytlačit bubliny skleněnou trubičkou.

5. Doba samotného blotování trvá 1 hodinu a proud se vypočítává dle velikosti blotovaného gelu v $\text{cm}^2 \times 1,5 \text{ mA}$.

4.7.3. Detekce proteinu pomocí protilátek na membráně

1. Blokování nitrocelulózové membrány při pokojové teplotě 2 hodiny, nebo nechat blokovat přes noc v lednici.
2. Inkubace membrány s primární protilátkou smíchanou s blokovacím roztokem při pokojové teplotě 1 hodinu.
3. Promytí membrány v blokovacím roztoku 3 x 15 minut.
4. Inkubace membrány se sekundární protilátkou smíchanou s blokovacím roztokem při pokojové teplotě 1 hodinu.
5. Promytí membrány v blokovacím roztoku 2 x 15 minut a 1 x 15 minut v PBS.
6. Detekce proteinů na membráně pomocí alkalické fosfatázy.

4.7.4. Imunofluorescence – *Giardia intestinalis*

Detekce peptidázy X v mitosomech *Giardia intestinalis* vysoce specifickou králičí protilátkou. Po celou dobu dbát, aby preparát nevyschnul.

1. Z narostlé zkumavky giardií odsát mrtvé buňky.
2. Zkumavku 20 minut chladit na ledu, poté řádně protřepat.
3. Sestavit komůrku – 2 podložní sklíčka + komůrka, upevnit svorkami.
4. Médium s buňkami vpravit do komůrek pomocí injekční stříkačky.
5. Komůrky s buňkami umístit do termostatu, 37 °C, 20 minut.
6. Odsátí média z komůrky a její rozebrání.
7. Fixace 5 minut ethanolem.
8. Narušení membrán fixací 5 minut v acetonu.
9. Blokování 1 hodinu v blokovacím roztoku.
10. Přidání primárních protilátek α -peptidáza X smíchanou s α -HAHA a s blokovacím roztokem (1:1000).
11. Blokování 1 hodinu s primárními protilátkami.

12. Promývání PBS 3 x 5 minut.
13. Přidání sekundárních protilátek α -Rabbit smíchanou s α -HAHA a s blokovacím roztokem (1:1000).
14. Blokování 1 hodinu se sekundárními protilátkami.
15. Promývání PBS 3 x 5 minut.

4.7.5. Montování preparátu

1. Preparát opatrně po stranách otřít.
2. Kápnout Vectashield s DAPI (obarví jádra buněk).
3. Přikrýt krycím sklíčkem a vytlačit bubliny.
4. Zalakovat okraje.
5. Skladovat ve tmě v lednici.

4.7.6. Fluorescenční mikroskopie

Pozorování preparátů pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81. Obraz zaznamenáván digitální kamerou Hamamatsu Orca-AG za použití programu cell[^]R imaging.

4.8. Pěstování giardií

4.8.1. Udržování kmene *Giardia intestinalis*, kmen WB (ATCC 30957)

1. Giardie ve zkumavkách v tzv. „ležáčcích“.
2. Ze dna zkumavky odsát kal (mrtvé buňky).
3. Inkubace 5 – 10 minut na ledě.
4. Řádné protřepání zkumavky.
5. V jedné třetině výšky zkumavky odebrat 3 až 4 kapky média s giardiemi a přemístit je do nového média TYI – S – 33 pro axenickou kultivaci *G. intestinalis*.
6. Přeočkování 2 x týdně, inkubace při 37°C v komorovém termostatu.

4.8.2. Velkoobjemové pěstování giardií

1. Inokulace giardií do lahvíček o velikosti 45 ml naplněných TYI – S – 33 médiem, inkubace při 37°C v komorovém termostatu.
2. Po třech dnech kontrola, zda kultura dobře narostlá.
3. Vylití narostlé kultury do 750 ml lahví s TYI – S – 33 médiem, inkubace při 37°C v komorovém termostatu po dobu 3 až 5 dní.

4.8.3. Sklizení buněk

1. Médium z lahví vylít do odpadu.
2. Do lahví nalít vychlazený fyziologický roztok a lahve umístit na led, dokud se buňky nepustí stěny lahve, pozorují pod mikroskopem.
3. Lahve řádně protřepat a přelít do centrifugačních lahví, vyvážit a stočit v předem vychlazené centrifuze na 1000 x g, 15', 4°C.
4. Opatrně odsát fyziologický roztok pasterkou.

4.9. Frakcionace

4.9.1. Příprava HSP (High Speed Pelet)

1. Napěstování giardií.
2. Stočení na 1000 x g, 10', 4°C.
3. Pelet rozsuspendovat ve 20 ml ST pufru, přidat inhibitory proteáz – 2 µl TLCK, 1 µl LEU.
4. Sonikace – amplituda 40, pulseur 1, 1 minuta, opakovat 3x.
5. Stočit při 500 x g, 10', 4°C, odebrat supernatant – na stěně zkumavky membrány a jádra.
6. Supernatant stočit na Ultra Beckmanovi – 45 000 RPM, 30', 4°C, rotor Ti 50.2, oddělení cytoplasmy (supernatant) od mitosomů (pelet).

4.9.2. Sodium karbonátová extrakce

Sodium karbonátová extrakce odhalí, zda je protein solubilní, či membránově zakotvený. Vysoké pH způsobí oddělení periferně asociovaných proteinů od membrány – nalezneme je pak v peletu.

1. Příprava čerstvého 100 mM Na₂CO₃, pufování na pH 11.
2. 50 µl HSP + 200 µl Na₂CO₃ – rozsuspendovat, nechat stát 30 minut ledě, občas zvortexovat.
3. Stočit v ultracentrifuze 30' při 100 000 x g, 2-4°C ve zkumavkách pro to určených.
4. Odebrat supernatant, k peletu přidat 100 µl pufru I a rozsuspendovat (pro vyrovnání pH přidávám Tris).
5. K supernatantu přidat 40 µl 50% TCA, inkubace 30 minut na ledě.
6. Stočit při 30 000 x g, 10', 4°C.
7. Promytí 500 ml acetonu.
8. Stočit při 30 000 x g, 10', 4°C.
9. Získaný pelet rozsuspenduji ve 100 µl pufru I, vzorky uvařit.
10. SDS PAGE, Western Blot.

4.10. Topologie proteinu - Protease Protection Assay

Touto metodou zjišťujeme suborganelární lokalizaci proteinu. K předem připravenému vzorku HSP přidány inhibitory proteáz – 5 µl LEU + 5 µl TLCK. Další postup dle tabulky 2 a 3.

Vzorek	Množství HSP/ul	Rozsuspendování v pufru	Další úprava
A	100	700 µl SEM	
B	100	700 µl EM	10 x propipetovat
C1	100	700 µl 500 mM NaCl 10 mM Tris pH 7.4	Sonikace – amplituda 60, 1'
C2	100	700 µl 500 mM NaCl 10 mM Tris pH 7.4 +PK	Sonikace – amplituda 60, 1'
D	100	660 µl SEM +40 ul 10% TritonX100	10 x propipetovat

Tabulka 2

Vzorky A, B a D rozděleny do třech zkumavek, vždy po 100 µl, vzorek C1 – 1 x 100 µl, vzorek C2 – 2 x 100 µl.

Vzorky	Množství vzorku	Přidání proteinázy K/SEM
A1	A -> 100 µl	5 µl SEM
A2	A -> 100 µl	5 µl PK
A3	A -> 100 µl	10 µl PK
B1	B -> 100 µl	5 µl SEM
B2	B -> 100 µl	5 µl PK
B3	B -> 100 µl	10 µl PK
C1	C1 -> 100 µl	5 µl SEM
C2	C2 -> 100 µl	5 µl PK
C3	C2 -> 100 µl	10 µl PK
D1	D -> 100 µl	5 µl SEM
D2	D -> 100 µl	5 µl PK
D3	D -> 100 µl	10 µl PK

Tabulka 3

Množství přidané proteinázy K nebo SEM pufru.

Další postup:

1. Inkubace 20 minut na ledě.
2. Přidat 2 µl 1 mM PMSF.
3. Inkubace 10 minut na ledě.
4. Přidat 100 µl BSA (1 mg/ml) pro vysrážení proteinů -> jdou do peletu.
5. Přidat 100 µl 50% TCA.
6. Inkubace 30 minut na ledě.
7. Stočit 14 000 x g, 30 min, 4°C.
8. Promýt acetonem.
9. Stočit 14 000 x g, 30 min, 4°C.
10. Rozsuspndovat pelet ve 2 x I, vzorky uvařit (vodní lázeň 3-5 minut, 100°C).
11. Loadování na gel.

4.11. Targetování do kvasinkové mitochondrie

4.11.1. PCR reakce

1. 12,5 µl master mix
2. 1 µl primer C
3. 1 µl primer D
4. 10 µl zavařených buněk s pept.X + bez pept. X (kontrola)
5. Nasedací teplota primerů během PCR – 58°C.

Použité primery: C – CATGTCTAGAAATGCGTTCTTCTATCGCC

D – CATGGAATTCAAGTTTTTCTGCTGAAGG

4.11.2. Miniprep – Hight Plasmid Isolation Kit

1. Stočit obsah narostlých bakterií v 50 ml zkumavce, 10 000 x g 5 minut.
2. Rozsuspendovat pelet ve 250 µl Suspension Buffer.
3. Přidat 250 µl Lysis Buffer, nechat stát 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidat 350 µl Binding Buffer, nechat stát 5 minut na ledě.
5. Centrifugace 10 minut, 10 000 x g.
6. Získaný supernatant přelít do kolonky s filtrem.
7. Centrifugace 13 000 x g, 1 minutu.
8. Vylít flow through, přidat 500 µl Wash Buffer I.
9. Centrifugace 13 000 x g, 1 minutu.
10. Vylít flow through, přidat 700 µl Wash Buffer II.
11. Centrifugace 13 000 x g, 1 minutu.
12. Vylíji flow through a znovu centrifugace při 13 000 x g, 1 minutu.
13. Horní část kolonky s filtrem umístit do ependorfky a přidat 100 µl elučního pufru.
14. Centrifugace 13 000 x g, 1 minutu.
15. V ependorfce je Purified Plasmid DNA.

4.11.3. Restrikce (Fast Digest)

PCR produkt (60 µl reakce)

1. 50 µl PCR produktu
2. 2 µl H₂O
3. 6 µl pufru (Fast Digest Buffer 10x)
4. 1 µl XbaI
5. 1 µl EcoRI

pUG35 (50 ul reakce)

1. 28 µl H₂O
2. 15 µl DNA
3. 5 µl pufru (Fast Digest Buffer 10x)
4. 1 µl XbaI
5. 1 µl EcoRI

Průběh restrikce 4 – 6 hodin při 37°C.

Vyčištění reakce PCR Purification Kit (eluovat ovšem jen 20 µl elučního pufru).

DNA elektroforéza.

4.11.4. DNA elektroforéza

1. 1 g agaru rozpustit ve 100 ml TEA Buffer.
2. Uvařit v mikrovlnné troubě.
3. Přidat 100 µl SYBR.
4. Nalít do elektroforetických misek a vložit hřeben.
5. Nechat gel ztuhnout.
6. Naladovat 2 µl Loading dye (standard) + vzorky.

4.11.5. Vyříznutí vzorku z gelu

1. Vzorek opatrně vyříznout skalpelem a vložit do ependorfký.
2. Přidat izopropanol a 10 minut inkubovat na bločku při teplotě 56 °C.

3. Vyzisolovat PCR produkt dle návodu Hight Pure PCR Product Purification Kit.

4.11.6. Ligace (10 µl reakce)

1. 6 µl PCR produktu (insert, peptidáza X)
2. 2 µl vektoru (pUG 35)
3. 1 µl T4 DNA ligační pufr (10x)
4. 1 µl DNA ligáza

Nutno udržovat stále na ledu. Pro kontrolu byla provedena ligace bez přítomnosti peptidázy X, kdy její místo bylo nahrazeno 6 µl H₂O. Ligováno přes noc v termobločku při teplotě 16°C.

4.11.7. Transformace do buněk

1. Buňky TOP10 nechat rozmraznout na ledu.
2. Přidat produkt ligace – peptidáza X pozitivní + negativní kontrola.
3. 20 minut nechat stát při pokojové teplotě.
4. Teplotní šok – 42°C vodní lázeň, 30 sekund.
5. Přidat 250 µl LB a 1 hodinu třepat v třepačce (225 otáček/minutu).
6. Natřít na plotnu s ampicilinem.
7. Inkubace v termostatu při 37°C O/N.

4.11.8. Zjištění pozitivní kolonie

1. Odebrat 3 samostatné kolonie ze středu narostlých ploten.
2. Rozsuspendovat ve 30 µl sterilní vody.
3. 10 µl suspenze buněk denaturovat na DNA cykléru – program CRACK, 20 minut.
4. Miniprep.
5. Kontrolní restrikce.

4.11.9. Kontrolní restrikce (20 µl reakce)

1. 2 µl Fast Digest Buffer

2. 10 μ l plazmidu s peptidázou X
3. 1 μ l EcoRI
4. 1 μ l XbaI
5. 6 μ l H₂O
6. DNA gel

4.11.10. Transformace kvasinek

1. Kvasinky nasazený do 25 ml tekutého média, růst 3 – 5 dnů.
2. Centrifugace 3000 x g, 5 minut, 21 °C.
3. Rozsuspendovat pelet ve 25 ml dd H₂O, centrifugovat při 1000 x g.
4. Rozsuspendovat v 900 μ l dd H₂O a přenést vzorek do ependorfky.
5. Centrifugace 13 000 x g, 1 minutu, získaný pelet rozsuspendovat v 0,1 M LiAc.
6. Inkubace 10 minut při teplotě 30 °C.
7. Rozpipetovat alikvoty po 100 μ l na každou transformaci.
8. Centrifugace při 13 000 x g, 1 minuta.
9. K peletu přidávat následující položky v tomto pořadí:
 - 300 μ l 40% PEG
 - 42 μ l 1 M LiAc
 - 10 μ l salmon sperm
 - 15 μ l plazmidu
 - 53 μ l dd H₂O
10. Celkový objem vzorku je 420 μ l, koncentrace LiAc je 0,1 M.
11. Vortexovat dokud se pelet nerozsuspenduje.
12. Inkubace ve 30°C po dobu 30 minut.
13. Heat shock 42°C po dobu 30 minut.
14. Centrifugace na maximum, 1 minuta.
15. Přidat 200 μ l dd H₂O a rozsuspendovat pipetou.
16. Zvortexovat a natřít na URA3 plotny.
17. Inkubace 2 – 4 dny, při 30°C v termostatu.

4.11.11. Barvení kvasinek, vytvoření preparátu

Provádíme pro ověření správnosti našeho zaklonování genu pro peptidázu X do kvasinek. Pro zjištění přítomnosti peptidázy X v mitochondriích kvasinek barvíme kvasinky barvou Mitotracker red, což je molekulární sonda pro mitochondrie.

1. Do ependorfy 1 ml kvasnicového média (ddH₂O + 1 kolonie kvasinek z plotny).
2. Přidat 2 µl barvy Mitotracker red.
3. Inkubace 30 minut při 30°C, občas promíchat.
4. Centrifugace 1000 x g, 10 sekund.
5. Promytí 1 ml fyziologického roztoku.
6. Centrifugace 1000 x g, 10 sekund.
7. Přidat 0,5 ml fyziologického roztoku, rozsuspendovat.
8. 10 µl suspenze buněk smíchat s 10 µl agarose low gelling na podložním sklíčku.
9. Opatrně promíchat a přiklopit krycím sklíčkem.

4.12. Zjišťování přítomnosti peptidázy X u *Spironucleus vortens*

4.12.1. Příprava lyzátu *Spironucleus vortens*

1. Stočit narostlé buňky 5 minut/ 900 x g, 4°C, vylít supernatant.
2. Do zkumavky 5 ml PEM pufru, 50 µl EDTA a půl tablety inhibitoru proteáz.
3. Obsah zkumavky smíchat s peletem a rozsuspendovat.
4. Stočit 5 minut/900 x g.
5. 30 µl peletu uvařit s 50 µl 5 x I.
6. SDS PAGE, imunobloting.

4.12.2. Imunofluorescence *Spironucleus vortens*

1. Do 10 ml buněčné kultury přidat 1 ml z 10% zásobního roztoku paraformaldehydu.
2. Stočit buňky 5 minut/ 900 x g, médium vylít.
3. Pelet promýt pufrům 1 x PEM 5 minut/ 900 x g.
4. Plastovou pastérkou opatrně rozsuspendovat pelet buněk v 1 x PEM pufru.
5. Krycí sklíčka pokrýt polylysinem a nechat uschnout (napipetovat 10 µl polylysinu na jedno krycí sklíčko a rozmáznout třením druhého krycího sklíčka 10 – 12 krát).

6. Polylysinová krycí sklička vložit do jamek 6 – jamkové destičky, plastovou pastérkou na ně kápnout buněčnou suspenzi, roztáhnout po skličku a nechat buňky sednout 15 minut.
7. Přebytek buněk odsát a na sklička opatrně nakapat 1 ml 0,1% tritonu TX100 v 1 x PEM pufru (5 μ l tritonu do 5 ml 1 x PEM pufru) – permeabilizace buněk.
8. Odsát triton a promýt buňky 3 x 30 sekund pomocí 1 x PEM pufru.
9. Preparáty blokovat v 0,5 ml roztoku PEMBALG po dobu 30 minut.
10. Inkubace preparátu s primární protilátkou naředěnou v PEMBALG přes noc na parafilmu v lednici (na jeden plátek parafilmu napipetovat 100 μ l primární protilátky (α -peptidáza X). Pomocí preparační jehly podebrat skličko z destičky a správnou stranou ho umístit na kapku protilátky. Překrýt druhým plátkem parafilmu. Okraje parafilmu spojit po obvodě).
11. Druhý den umístit preparáty pomocí pinzety opět do 6 – jamkové destičky a promýt 3 x v 1 x PEM pufru 5, 10 a 15 minut.
12. Inkubovat 1 hodinu se sekundární protilátkou (α -rabbit, koncentrace 1:1000) naředěnou v roztoku PEMBALG.
13. Promýt preparáty 3 x v 1 x PEM pufru 5, 10 a 15 minut.
14. Na podložní sklo kápnout Vectashield s DAPI a přikrýt krycím sklíčkem s buňkami.

4.13. Testování aktivity

4.13.1. Cleavage assay

1. Namíchat 3x 100 μ l reakci: 40 μ l nativní peptidázy X + 20 μ l GRX5 + 40 μ l pufru + BSA (1mg/ml) + 50%TCA.
2. Inkubace jednotlivých reakcí 5, 10 a 30 minut při teplotě 37°C.
3. SDS PAGE – 10% gel., Western blot a imunobloting– α -GRX5 (1:1000), α -peptidáza X (1:2000).

4.13.1.1. Purifikace peptidázy X za nativních podmínek

1. Rozsuspendovat pelet ve 20 ml lyzačního pufru.

2. Přidat lyzozym (1 mg/ml), Dnazu (5 mg/ml), pečlivě promíchat.
3. Rozrušení buněčných stěn French pressem.
4. Homogenát buněk stočit v centrifuze (Beckman) na 30 minut, 45000 x g, 4°C.
5. Odebrat vzniklý supernatant, přidat 1 ml agarózy.
6. Ponechat 30 minut kývat na ledě.
7. Nechat vzorek prokapat purifikační kolonou (flowthrough).
8. 2x nechat prokapat objem kolony pufrem C (wash 1, wash 2).
9. Eluce proteinu z kolony 4 x pufrem D, 4 x pufrem E a 4 x pufrem F.

4.13.1.2. Exprese glutaredoxinu

1. Transformace plazmidu s glutaredoxinem5 do buněk BL21.
2. Transformované buňky natřít na plotnu a nechat přes noc růst při teplotě 37°C.
3. Do 20 ml LB+KAN (na 1 ml LB/ 1 µl KAN) seškrábnout kolonii narostlých buněk s GRX5 a třepat 225 otáček/min při 37°C O/N.
4. Do 1 l LB+KAN vylít narostlé buňky, třepat 225 otáček/min při 37°C.
5. Při dosažení OD 0,5 schladit medium s buňkami na 20°C, přidat 100 µl IPTG a 1000 x zředěný citrát železitoamonný.
6. Třepat 225 otáček/min při 37°C O/N (pro lepší expresi buněk).
7. Purifikace za denaturačních podmínek - lyze buněk pufrem A (obsahuje guanidium chlorid), po lyzi stočit homogenát na maximum otáček po dobu 15 min (aby byl guanidium chlorid v peletu), jinak postup totožný (viz výše).
8. SDS PAGE, Western blot (protilátka proti glutaredoxinu5, anti-rat, ředění 1:1000).
9. Zahuštění vzorků v separační zkumavce, (Amicon, cut off 10 kDa).
10. Převedení vzorku do nižší koncentrace močoviny.

4.13.1.3. Protokol na měření aktivity s IMP

1. Indukované + neindukované bakterie s peptidázou X, třepat 2-3 hodiny.
2. Smíchat 2 ml pufru pro měření aktivity s IMP + 20 µl IMP, promíchat a změřit hodnotu na spektrometru o vlnové délce 340 nm.

3. K předešlé reakci přidat 5 μ l peptidázy X, promíchat a změřit na spektrometru.
4. K předešlému přidat 20 μ l NAD^+ , promíchat a změřit na spektrometru.

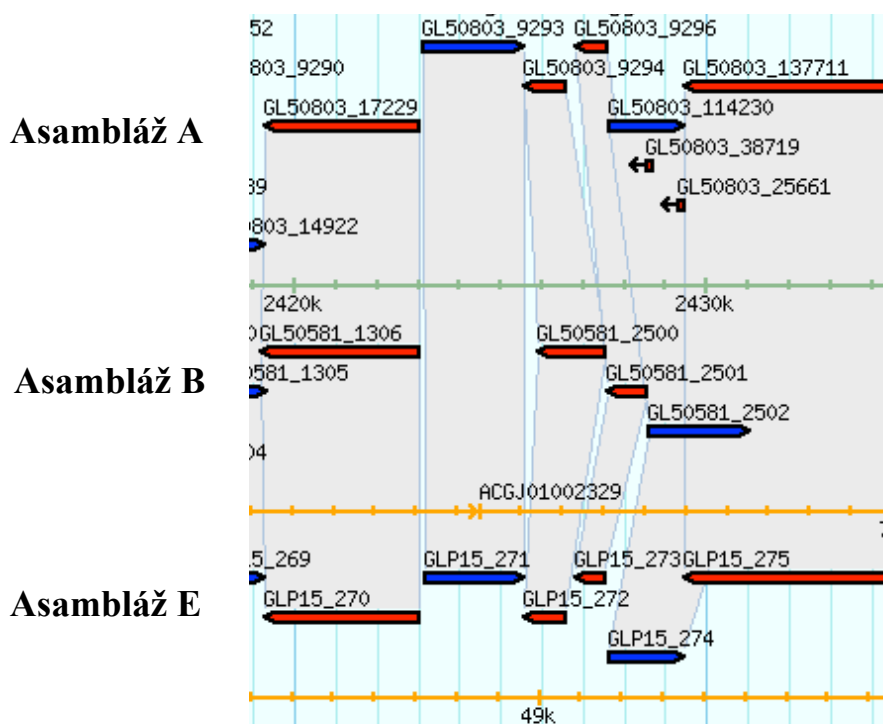
4.13.2. Substrátová elektroforéza s želatinou (Gelatin)

1. Příprava čerstvé 1% želatiny – 10 mg do 1 ml destilované vody (rozpuštění pomůže zahřátí epinky např. pod horkou vodou).
2. Použijeme 400 μ l zásobního roztoku na jeden gel (4 ml) místo destilované vody z rozpisu chemikálií používaných na SDS gel (např. pro jeden 12% gel 1,4ml dH_2O + 400 μ l želatiny).
3. Dále postup shodný jako u SDS Page, jen celé probíhá na ledu (kvůli proteinu v nativním stavu).
4. Gely po elektroforéze inkubovat při teplotě 37°C přes noc, jeden při pH 6 a druhý při pH 8.
5. Gely barvit v Coomassie Brilliant Blue R – 250.

5. Výsledky

5.1. Bioinformatická analýza sekvence

Proteomická analýza buněčné frakce *G. intestinalis* obohacené o mitosomy odhalila přítomnost proteinu o velikosti 241 aminokyselin (Jedelský et al., 2011). BLAST analýzy proteinové sekvence odhalily naprostou jedinečnost našeho proteinu, která byla potvrzena i negativním výsledkem z Pfam databáze (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). GL50803_9296 tak zřejmě není homologní s žádným dosud známým proteinem. Je však přítomen u všech sekvenovaných asambláží giardie (**Obrázek 5**). Proteinové sekvence z jednotlivých asambláží si jsou velmi podobné (**Obrázek 6**). Teoretická molekulární hmotnost proteinu byla předpovězena na 26,1 kDa, izoelektrický bod má hodnotu 9,9 (<http://giardiadb.org/giardiadb/>). Aby nebyl náš neznámý protein nazýván pouhou kombinací písmen a číslic GL50803_9296, byl pracovně pojmenován peptidáza X.



Obrázek 5

Porovnané 3 giardiové asambláže. A a B – lidské Giardie, E – Giardie kopytníků

Zdroj obrázku: www.giardiadb.org

```
Asambláž A MRSSIAAVTAGITSSLLRDSISGTRLTIAGIAPGELQPKKTYLYKSVKSVAINRGICSNIFSEPDCTTVPGIMQYPLRAA
Asambláž B .....V.....T.VT.....N.....T.GQ...N...P.....NLC..IR.....
Asambláž E .....H.....N.I.....S.V.....

Asambláž A TKLVLSDLLDQCVDLAFTGSLGDP LHTGKPSMQPSRTPSIVDKAVRSRPKLELERLDKPSMTTPEYWKRFMSDVLVSTAS
Asambláž B ...A...V.....G.V...R.LG...LPK.Q.TGGR.AIAK.E-----V.R...R...N...N...
Asambláž E .....I.....V.AR.S.....A...I...S--.K.R.....

Asambláž A DLVYDVGRKRAAMINSGSNPSTMDVATWAFASAAAGEFVRAKLDNKYTPDYIRAGVRSATFKTSFAYVYALLMASPSAEK
Asambláž B .....I.....V..T.....K..MK.....S.....PV.N
Asambláž E .....I.....V..T.....V.....L.....

Asambláž A L
Asambláž B P
Asambláž E F
```

Obrázek 6

Alignment proteinové sekvence GL50803_9296 s homologními sekvencemi z asambláže B (GLP15_273) a asambláže E (GL50581_2501). Porovnáním sekvencí bylo identifikováno 51 aminokyselinových záměn mezi asamblážemi A a B a 21 záměn mezi asamblážemi A a E.

5.1.1. Detekce mitosomální targetovací sekvence peptidázy X

Dosud známé mitosomální proteiny vlastní N-terminální targetovací sekvenci, která je po transportu do organely odštěpena mitosomální procesující peptidázou (Šmíd et al., 2008).

Protein	Přístupové číslo	N-terminální targetovací sekvence
IscU	GL50803_15196	MTSLQLSSTSLLOSVARF* LTKK
Nfu	EAA38809	MLSLLPTHSMLGLVTRNLLITSSQSSKPRS* YIM A
IscA	GL50803_14821	MLPALITPLVRSLTKNGIKITDAAVSSLRNLIKPS SEFLRV* NVMT
Glutaredoxin 5	GL50803_2013	MDQINGGLFPKALALTRYASRG* LILG
Hsp70	GL50803_14581	MLKRHVKCLGFDLGTNSCVSTMVSGVPTVLPML DGSRT* VPSV
GrpE	GL50803_1376	MALSALSPSSMAGTSVLMRLMRG* LVKP
Jac1	GL50803_17030	MALPTLFSAANSSTILGRIERYLKHCWKCGTKQP VTILCSGCGALQPISRP* TNYF
Cpn60	GL50803_103891	Není predikována
Cpn10	GL50803_29500	MSLLVLGPRF* LLER
ferredoxin	GL50803_27266	MSLLSSIRRFITFRV* VQQG
GiOR-1	GL50803_91252	MALSIVYATVGGTARN* LAHK
Pam18	XP_002364144	MLRVLSENRFPLSLVAGVVAGFYSLRKDPRVIV TSPPRS* WKGE
Pam16	GL50803_19230	MLLPKAGVEIAKGLTAGVRS* SLSV
GPP	GL50803_9478	MLIRD* IVPG
Hypotetický protein	GL50803_14939	MPAHRHSRSSLRTSAAAIASATLIAGGLAGLGYG VYRMVRN* YQFH
Peptidáza X	GL50803_9296	MRSSIAAVTAGITSSLLRDSISGTRLTIAGIAPG ELQPKKTYLYKSVKSVAINRG* ICSN

Tabulka 3

Přehled délky N-terminálních targetovacích sekvencí, jak byly předpovězeny PSORTII.

Pro detekci možné targetovací sekvence peptidázy X jsme použili několik predikčních programů. Ty s různou pravděpodobností předpověděly mitosomální/mitochondriální lokalizaci (viz **tabulka 3 a 4**). Slabinou predikčních programů pro určení lokalizace proteinů je jejich nastavení, které je zaměřené na targetovací signály živočichů, hub a rostlin.

Predikční program	Pravděpodobnost v mitochondrii/mitosomu	www adresa predikčního programu
PSORT II	56,5%	http://psort.hgc.jp/form2.html
MITOPROT	73,5%	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html
TargetP	45,1%	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
Multiloc2	6%	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2

Tabulka 4

Pravděpodobnost výskytu proteinu v mitochondrii/mitosomu.

PSORT II předpověděl pravděpodobnosti lokalizace proteinu v buňce: s 56,5% pravděpodobností je přítomen v mitochondrii, s 26,1% v jádře, 8,7% v cytoplasmě, 8,7% v cytoskeletu. MITOPROT a TargetP predikovaly pouze mitochondriální lokalizaci. Multiloc2 předpověděl poměrně malou pravděpodobnost přítomnosti proteinu v mitochondrii, dle tohoto programu je protein se 73% pravděpodobností lokalizován v cytoplasmě.

Predikce dle algoritmu GAVEL (součást PSORT II) předpověděla místo štěpení targetovací sekvence do oblasti NRG/IC. Jednalo by se tak o 55 aminokyselin dlouhou mitosomální targetovací sekvenci, nejdelší dosud známou. Tato délka však není pro mitochondriální/mitosomální proteiny obvyklá. Z tohoto důvodu jsme se pokusili hledat další možné a kratší varianty targetovací sekvence dle pravidla R-2, argininový zbytek leží dvě pozice před místem štěpení. Kromě dlouhé sekvence predikované PSORT II (1. varianta) jsme předpověděli dvě další možné délky (2. a 3. varianta).

1. varianta délky presekvence: NRG-IC

MRSSIAAVTAGITSSLLRDSISGTRLTIAGIAPGELQPKKTYLYKSVKSVAINRGICSNIF
 SEPDCTTVPGIMQYPLRAATKLVLSDLLDQCVDLAFTGSLGDPLHTGKPSMQPSRTPS
 IVDKAVRSRPKLELERLDKPSMTTPEYWKRFMSDVLVSTASDLVYDVGRKRAAMIN
 SGSNPSTMDVATWAFASAAAGEFVRAKLDNKYTPDYIRAGVRSIAIFKTSFAYVYALL
 MASPSAEKL

Po odštěpení targetovací sekvence by zbyl protein o velikosti 20,4 kDa.

2. varianta délky targetovací sekvence: LRD-SI:

MRSSIAAVTAGITSSLLRDSSISGTRLTIAGIAPGELQPKKTYLYKSVKSVAINRGICSNIF
SEPDCTTVPGIMQYPLRAATKLVLSDLLDQCVDLAFTGSLGDPLHTGKPSMQPSRTPS
IVDKAVRSRPKLELERLDKPSMTTPEYWKRFMSDVLVSTASDLVYDVGRKRAAMIN
SGSNPSTMDVATWAFASAAAGEFVRAKLDNKYTPDYIRAGVRS AIFKTSFAYVYALL
MASPSAEKL

Po odštěpení targetovací sekvence by zbyl protein o velikosti 24,2 kDa

3. varianta délky targetovací sekvence: TRL-TI

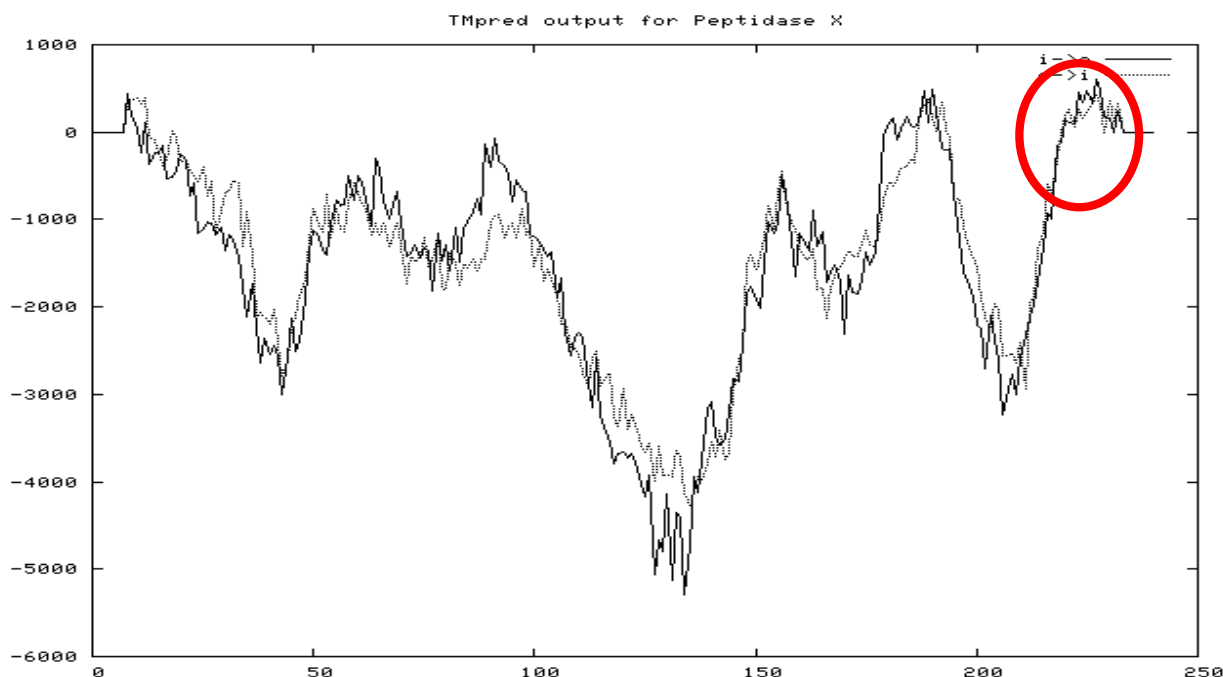
MRSSIAAVTAGITSSLLRDSISGTRLTIAGIAPGELQPKKTYLYKSVKSVAINRGICSNIF
SEPDCTTVPGIMQYPLRAATKLVLSDLLDQCVDLAFTGSLGDPLHTGKPSMQPSRTPS
IVDKAVRSRPKLELERLDKPSMTTPEYWKRFMSDVLVSTASDLVYDVGRKRAAMIN
SGSNPSTMDVATWAFASAAAGEFVRAKLDNKYTPDYIRAGVRS AIFKTSFAYVYALL
MASPSAEKL

Po odštěpení by zbyl protein o velikosti 23,5 kDa.

5.1.2. Topologie proteinu

Pomocí hydrofóbního plotu se nám podařilo charakterizovat C-terminální transmembránovou doménu, která obsahuje 24 většinou hydrofóbních AMK. Pomocí tohoto plotu byl vytvořen graf ze sekvence podle vlastností jednotlivých AMK (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (**Obrázek 7**). Protein by tak mohl být C-terminálně zakotven do membrány. Je však nutno poznamenat, že řada dalších algoritmů přítomnost C-terminální transmembránové domény nepředpověděla, a je tak možné, že se jedná o zcela rozpustný protein.

MRSSIAAVTAGITSSLLRDSISGTRLTIAGIAPGELQPKKTYLYKSVKSVAINRGICSNIF
SEPDCTTVPGIMQYPLRAATKLVLSDLLDQCVDLAFTGSLGDPLHTGKPSMQPSRTPS
IVDKAVRSRPKLELERLDKPSMTTPEYWKRFMSDVLVSTASDLVYDVGRKRAAMIN
SGSNPSTMDVATWAFASAAAGEFVRAKLDNKYTPDYIRAGVRS AIFKTSFAYVYALL
MASPSAEKL



Obrázek 7

TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) navrhl model, že v místě mezi 219 – 238 aminokyselinou se nachází transmembránová doména.

5.2. Exprese proteinu

Pro experimentální charakterizaci proteinu bylo nutné vytvořit si specifickou polyklonální protilátku. Pro její vytvoření bylo zprvu nutno připravit si rekombinantní protein. Za tím účelem byl pomocí PCR naamplifikován úsek DNA bez nejdelší predikované targetovací sekvence a vložen do vektoru pET42b. Přítomnost targetovací sekvence by mohla výrazně snížit rozpustnost proteinu v expresním kmenu *E. coli*.

5.2.1. Klonování

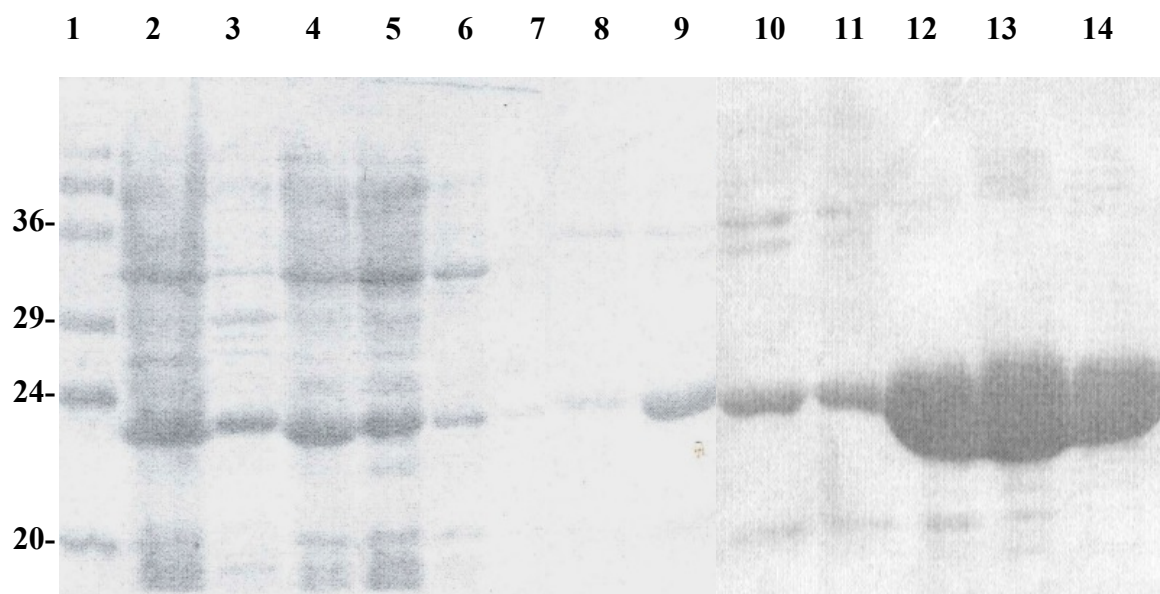
Pomocí PCR byl namnožen úsek genu kódující peptidázu X bez targetovacího peptidu. Po restrikci pomocí NdeI a XhoI byl gen vložen do vektoru pET42b a po kontrolní sekvenaci byl použit pro expresi rekombinantního proteinu.

5.2.2. Indukce v bakteriích

Připravený vektor jsme vložili do buněk BL21, které umožňují nadprodukcii rekombinantních proteinů. Po indukci exprese proteinu byl za denaturačních podmínek připraven buněčný lyzát. Po centrifugaci lyzátu se naprostá většina proteinu nacházela v supernatantu, což nám umožnilo přistoupit k vlastní afinitní purifikaci na niklové koloně a ze získaných vzorků byla provedena SDS PAGE, western blot a imunobloting (**obrázek 8 a 9**).

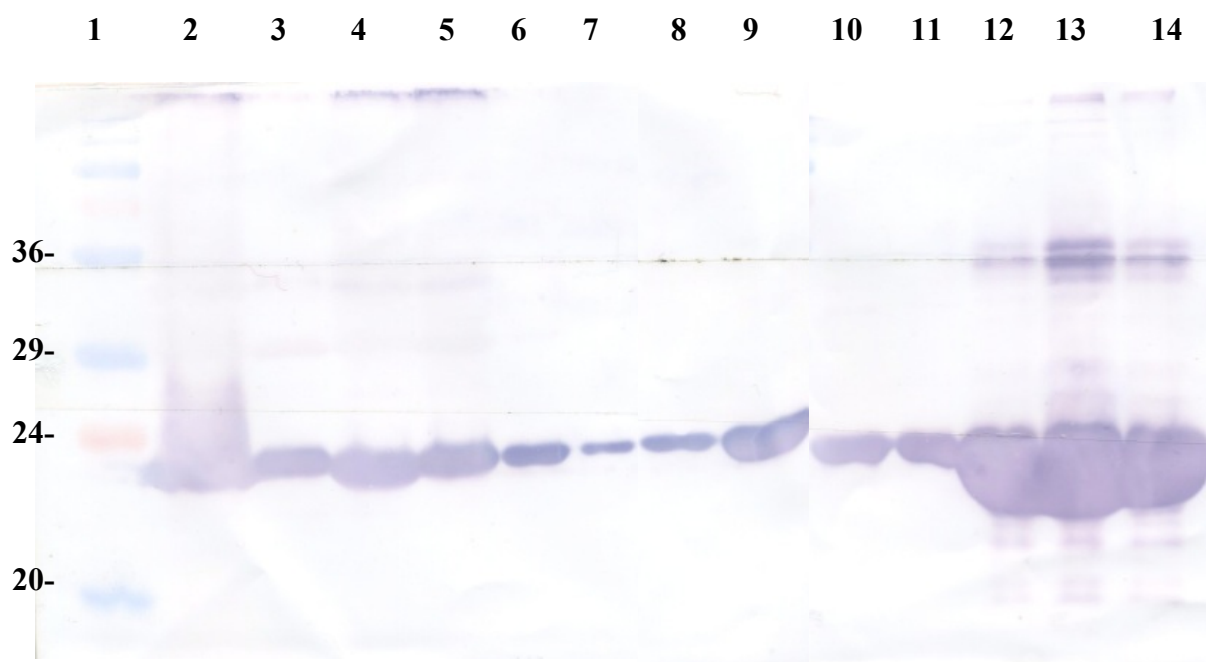
Po eluci proteinů z kolonky byly nejbohatší frakce 9 až 14 smíchány a výsledný vzorek byl zahuštěn pomocí centrifugačního filtru do 2 ml a pomocí namíchaného pufru převeden do 4M močoviny, což je maximální povolená koncentrace pro imunizaci laboratorního zvířete (**obrázek 10**).

Před odesláním vzorku pro komerční imunizaci do firmy Eurogentec (Belgie) byl vzorek rozdělen do čtyř alikvót a lyofilizován.



Obrázek 8

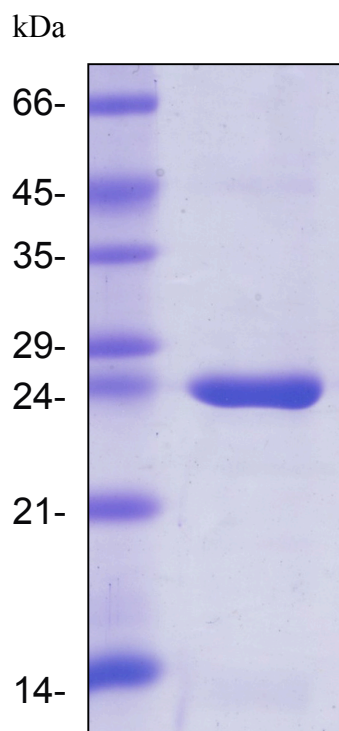
Izolace proteinu na Ni-NTA koloně. SDS PAGE znázorňující množství proteinu, které je obsaženo v jednotlivých frakcích. 1 ladder; 2 pelet; 3 supernatant; 4 flowthrough; 5-6 promytí pufrům o pH 6,3; 7-10 promytí pufrům o pH 5,9; 11-14 promytí pufrům o pH 4,5.



Obrázek 9

Detekce his-tagu na peptidáze X pomocí western blotu

1 ladder; 2 pelet; 3 supernatant; 4 flowthrough; 5-6 promytí pufrem o pH 6,3; 7-10 promytí pufrem o pH 5,9; 11-14 promytí pufrem o pH 4,5.

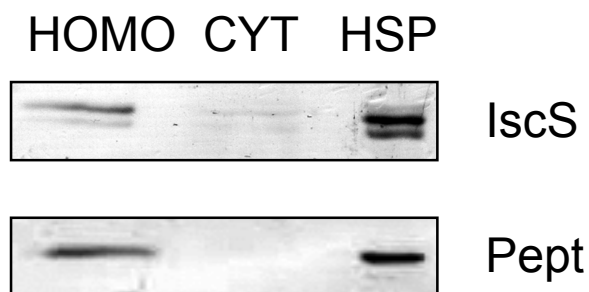


Obrázek 10

Zahuštěný vzorek před lyofilizací.

5.3. Testování protilátky

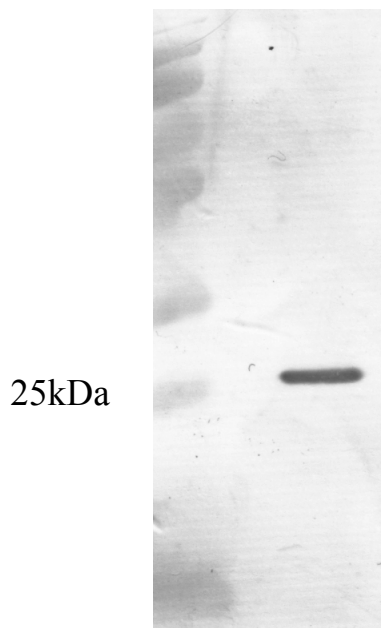
Specifita získaného králíčího séra proti peptidáze X byla nejdříve předběžně testovaná pomocí western blotu na buněčném lyzátu *G. intestinalis*. Tato analýza ukázala, že sérum obsahuje specifické protilátky rozeznávající protein o správné velikosti kolem 24 kDa. Proto byly připraveny buněčné frakce giardií z divokého kmene WB1. Metodou frakcionace (viz materiál a metodika 4.9) byly získány buněčné složky, jež byly následně testovány protilátkami. Kromě peptidázy X byla jako kontrola použita protilátka proti mitosomálnímu proteinu IscS. Oba proteiny byly specificky detekovány ve frakci peletu, získaného za vysokých otáček (high-speed pelet - HSP), který je obohacen o mitosomy. (**obrázek 11**).



Obrázek 11

Ověření lokalizace IscS v HSP, u peptidázy X byla tímto pokusem přítomnost v cytosolu vyvrácena. Vysvětlivky: HOMO-homogenát, CYT-cytoplasma, HSP-high speed pelet, IscS-cystein desulfuráza, Pept-peptidáza X

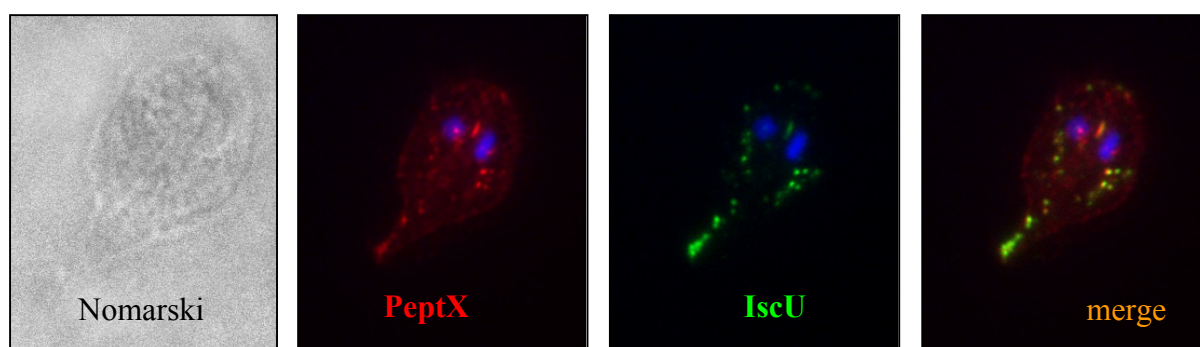
Na základě western blotu jsme rovněž zjistili přibližnou velikost proteinu 25 kDa, čemuž dle bioinformatické predikce odpovídá nejkratší varianta délky targetovací sekvence (varianta č.2). jak je patrné na **obrázku 12**. Přestože se jedná o velmi nepřímé stanovení místa procesování proteinu, tato délka targetovací sekvence odpovídá situaci u dalších mitosomálních proteinů (Šmíd et al., 2008).



Obrázek 12

Western blot, ověření velikosti peptidázy X testováním protilátky na buněčném lyzátu giardií. Velikost proteinu je cca 25 kDa.

Pro potvrzení lokalizace peptidázy X v mitosomech *Giardia intestinalis* byla dále provedena nepřímá imunofluorescence (**obrázek 13**). Protein byl značen HA-tagem a byl detekován monoklonální protilátkou anti-HA. Jako mitosomální marker posloužila protilátka anti-IscU. Překryv obou signálů jasně dokazuje targetování peptidázy X do mitosomů.



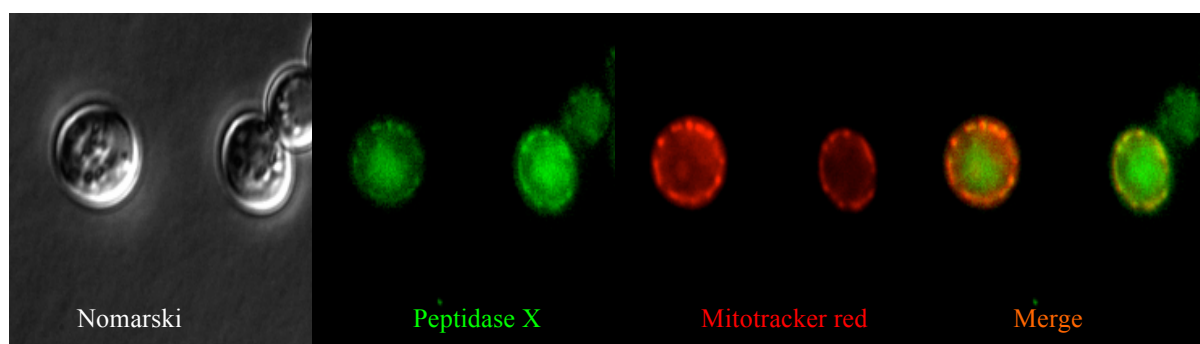
Obrázek 13

Lokalizace peptidázy X v mitosomech *Giardia intestinalis* fluorescenční mikroskopií. Protein byl exprimován jako C-terminální fúze s HA-tagem (červená), zeleně je značen mitosomální marker IscU, žlutě je překryv obou signálů.

5.4. Targetování do kvasinkové mitochondrie

Expresí v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* jsme se pokusili ověřit vlastnosti targetovací sekvence peptidázy X, tj. rozpoznání a transport mitochondriální importní mašinerie. (**Obrázek 14**). Kompletní sekvence peptidázy X byla zaklonována do kvasinkového expresního vektoru pUG35, který obsahuje C-terminální GFP.

Po transformaci a selekci buněk *S. cerevisiae* byly živé buňky kvasinek pozorovány fluorescenčním mikroskopem. Jako mitochondriální marker byl použit Mitotracker® Red TM. Bylo zjištěno, že targetovací informace na molekule peptidázy X může být rozpoznávána nejen redukovanou mitochondrií giardie ale i komplexní mitochondrií kvasinek.



Obrázek 14

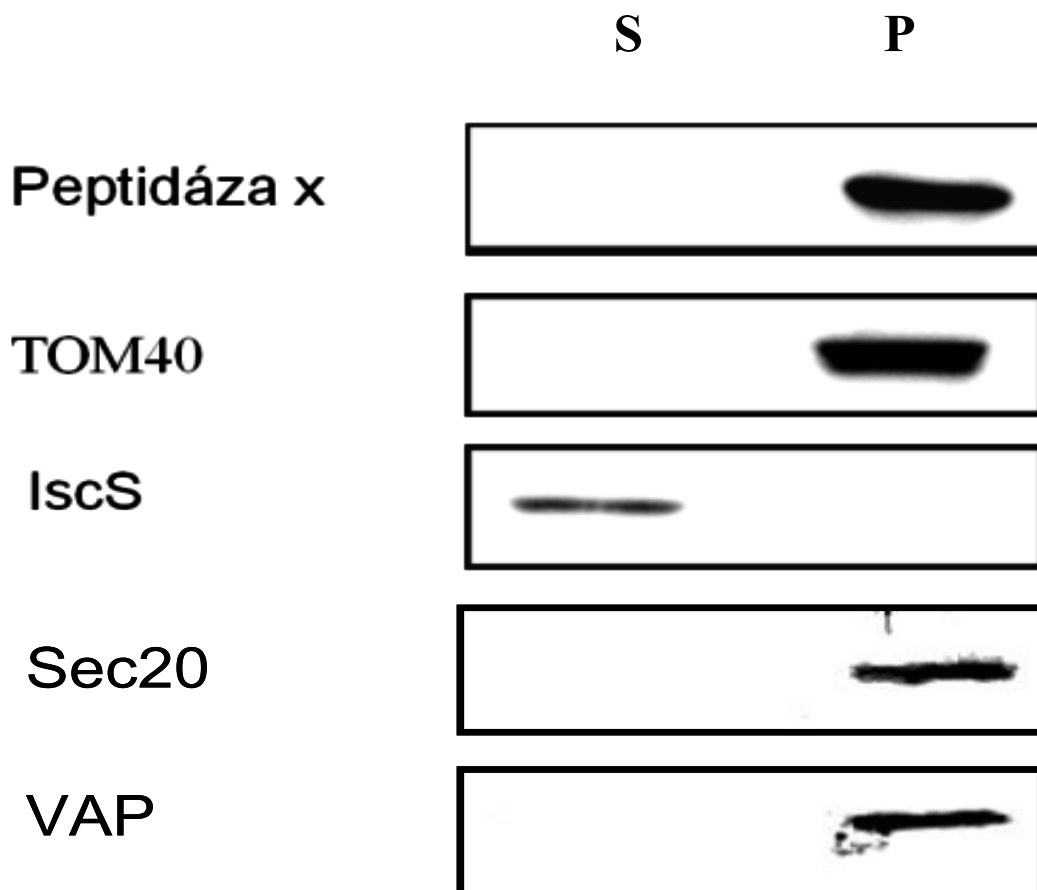
Po transformaci lze vidět buňky znázorňující GFP fúzi peptidázy X. Nomarski - Nomarského diferenciální kontrast, Peptidase X - zelená barva znázorňuje náš protein, který je značen GFP, Mitotracker red - což je mitochondriální červená barva, Merge - překryv obou signálů, což znázorňuje přítomnost peptidázy X v mitochondriích kvasinky.

5.5. Experimentální určení topologie proteinu

5.5.1. Sodium carbonátová extrakce

Metoda extrahování proteinů uhličitánem sodným posloužila ke zjištění, zda je peptidáza X skutečně membránově zakotvený či volně rozpustný protein. Vysoké pH způsobuje oddělení periferně asociovaných proteinů od membrány. Po inkubaci v uhličitanu a následné centrifugaci se v získaném peletu nacházejí jen proteiny s transmembránovou doménou, vždy

je však třeba provést kontrolní stanovení distribuce proteinů o známých vlastnostech. Velice důležitá je také příprava čerstvého Na_2CO_3 . Po extrakci proteinů byly pelet i supernatant testovány pomocí western blotu (**Obrázek 15**).



Obrázek 15

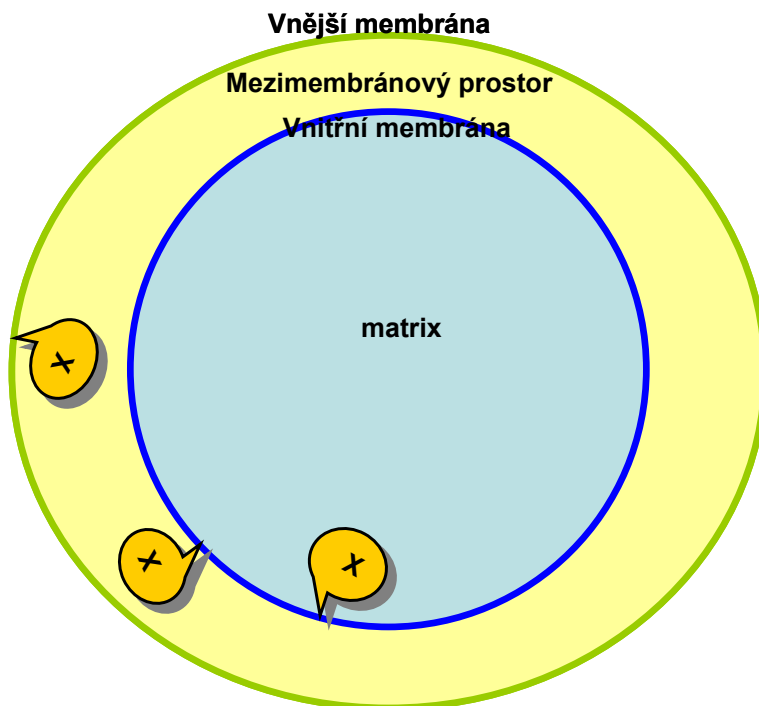
Ověření přítomnosti proteinů v buněčných frakcích. S – supernatant, solubilní proteiny, P – pelet, membránově zakotvené proteiny. Peptidáza X se nachází v peletu – jedná se tedy o membránově zakotvený protein.

Tom40-protein vnější membrány mitosomů, IscS-solubilní mitosomální protein, VAP i Sec20-proteiny endomembránového systému s jednou C-terminální transmembránovou doménou.

5.5.2. Stanovení topologie proteinu - Proteasse protection assay

Na základě zjištěných vlastností peptidázy X: mitosomální lokalizace a membránové ukotvení, jsme se pokusili určit přesnou orientaci proteinu v mitosomálních subkompartmentech. Ačkoli je již známo, že je peptidáza X membránově ukotvený protein, stále se nabízejí různé varianty její přesné lokalizace. Může tak být ukotvena ve vnější

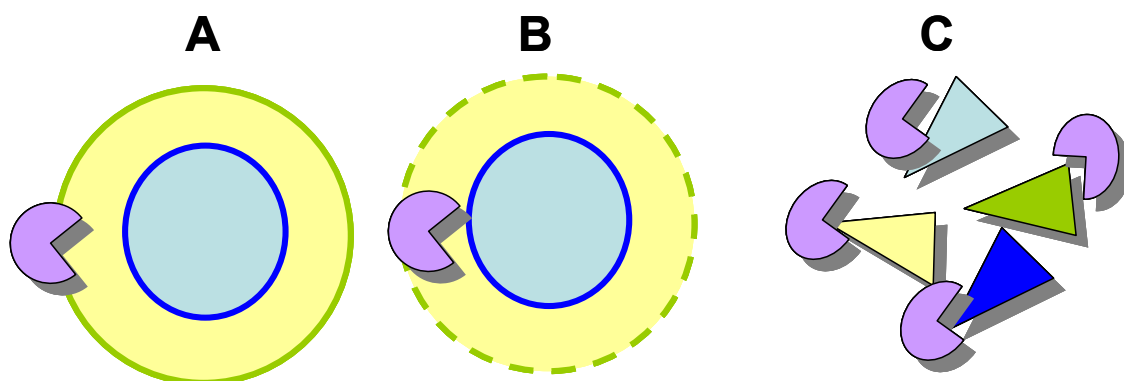
membráně orientována směrem do mezimembránového prostoru, nebo může být přítomna na vnitřní membráně s orientací směrem ven, či do nitra organely (viz **obrázky 16 a 17**).



Obrázek 16

Možná lokalizace peptidázy X v mitosomu.

Protein může být ukotven ve vnější membráně orientován směrem do organely (obsahuje mitochondriální targetovací signál), na vnitřní membráně s orientací buď do mezimembránového prostoru, či do matrix organely. Zeleně – vnější mitosomální membrána, žlutě – mezimembránový prostor, tmavě modře – vnitřní mitosomální membrána, světle modře – matrix mitosomu.



Obrázek 17

Schéma průběhu Proteasse protection assay

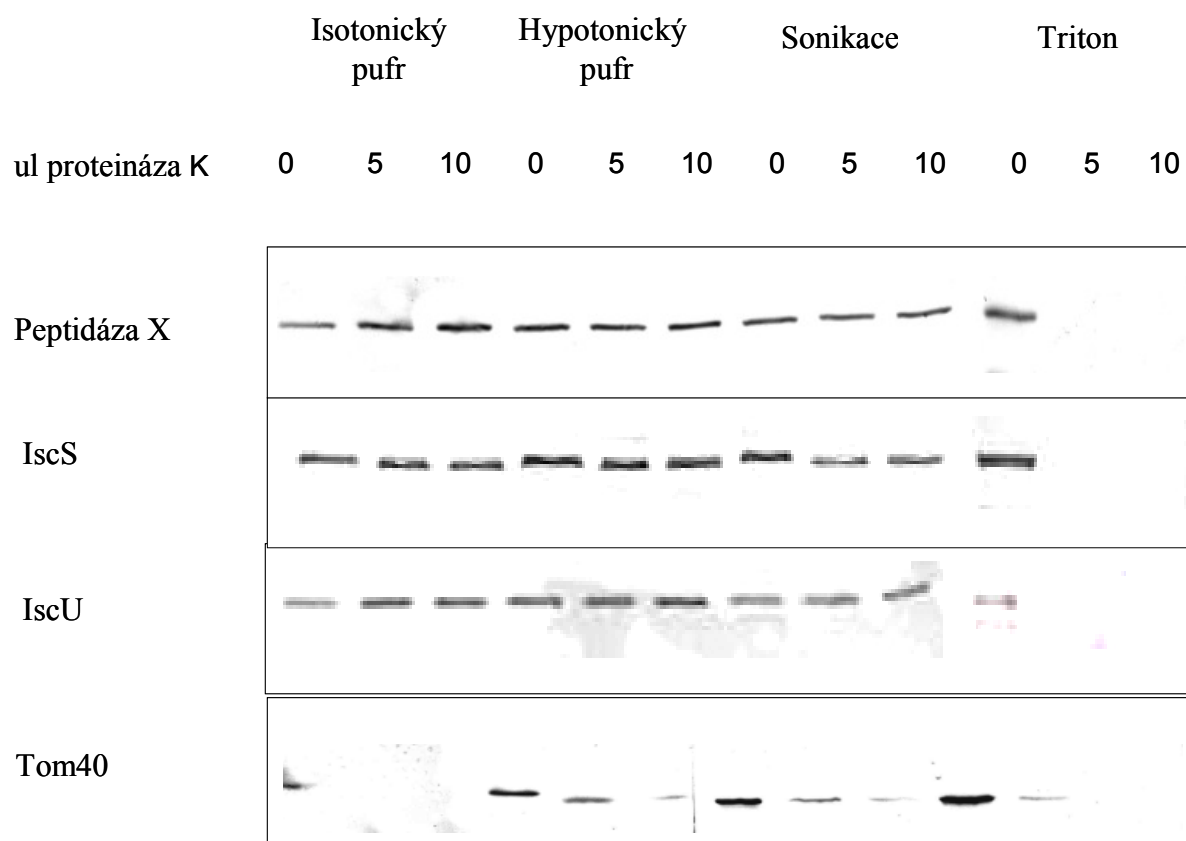
Zeleně – vnější mitosomální membrána, žlutě – mezimembránový prostor, tmavě modře – vnitřní mitosomální membrána, světle modře – matrix mitosomu, fialově – proteináza K.

A - Izolované organely v isotonickém pufru, proteináza K degraduje pouze proteiny vnější mitosomální membrány

B - Izolované organely v hypotonickém pufru, proteináza K degraduje proteiny v mezimembránovém prostoru,

C - Izolované organely v 0,5% tritonu, totální degradace všech mitosomálních proteinů

K odhalení suborganelární lokalizace peptidázy X byla použita metoda Proteasse protection assay. Pro tento pokus jsme použili pouze buněčnou frakci high-speed pelet. Nastavením různých podmínek pak pozorujeme, které proteiny odolají aktivitě proteinázy K. Pro kontrolu byly použity proteiny IscS a IscU nacházející se v matrix organely a TOM40, protein vnější membrány. Po jednotlivých inkubacích (viz Metody a **Obrázek 18**) byly proteiny vysráženy pomocí TCA a analyzovány pomocí western blotu s protilátkami proti peptidáze X, IscS, IscU a Tom40. Zatímco všechny testované proteiny byly degradovány u vzorků s přidaným tritonem, v ostatních inkubacích došlo k zachování peptidázy X i obou markerových matrixových proteinů. Odolnost vůči aktivitě proteinázy K tak vypovídá o přítomnosti proteinu v mitosomálním matrix.

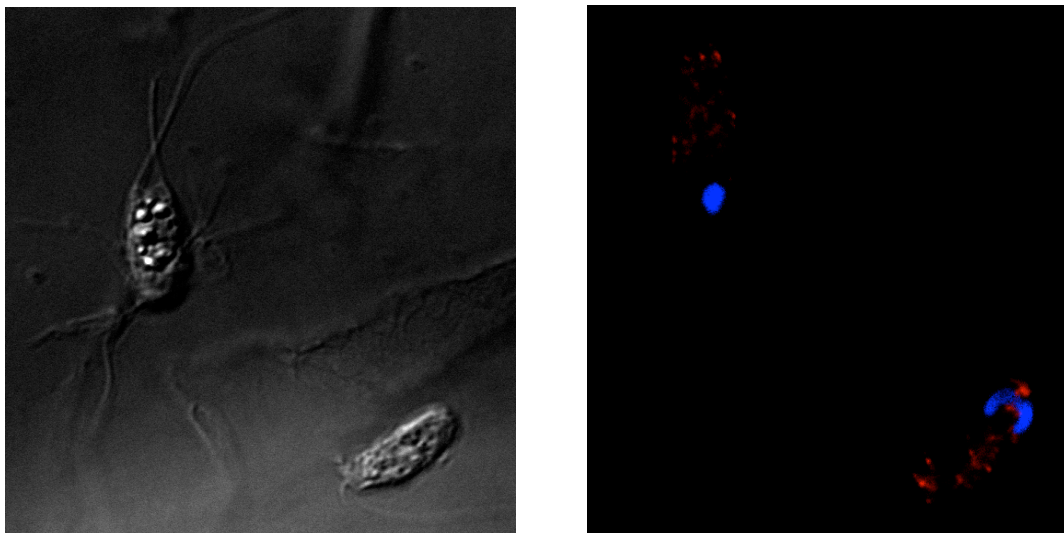


Obrázek 18

Izolované orgány v isotonickém pufru - proteináza K degraduje pouze proteiny vnější mitosomální membrány; izolované orgány v hypotonickém pufru - proteináza K degraduje proteiny v mezimembránovém prostoru, peptidáza X zůstala intaktní; izolované orgány v 0,5% tritonu - totální degradace všech mitosomálních proteinů.

5.6. Distribuce peptidázy X u *Spironucleus vortens*

Vzhledem k tomu, že peptidáza X nebyla identifikována u žádného dalšího organismu pomocí BLAST analýz, pokusili jsme se zjistit přítomnost peptidázy X u příbuzného anaerobního prvoka *Spironucleus vortens* (genomová sekvence není k dispozici). Pomocí western blotu a imunofluorescenční mikroskopie jsme využili získané protilátky ke zjištění přítomnosti peptidázy X. Na preparátech *S. vortens* došlo ke specifickému značení buněčných struktur, které připomínaly mitosomy *G. intestinalis* (**Obrázek 19**). Přítomnost peptidázy X však nebyla opakovaně potvrzena během western blot analýzy buněčného lyzátu. Z toho důvodu se domníváme, že detekovaný signál při imunofluorescenci není specifické povahy.



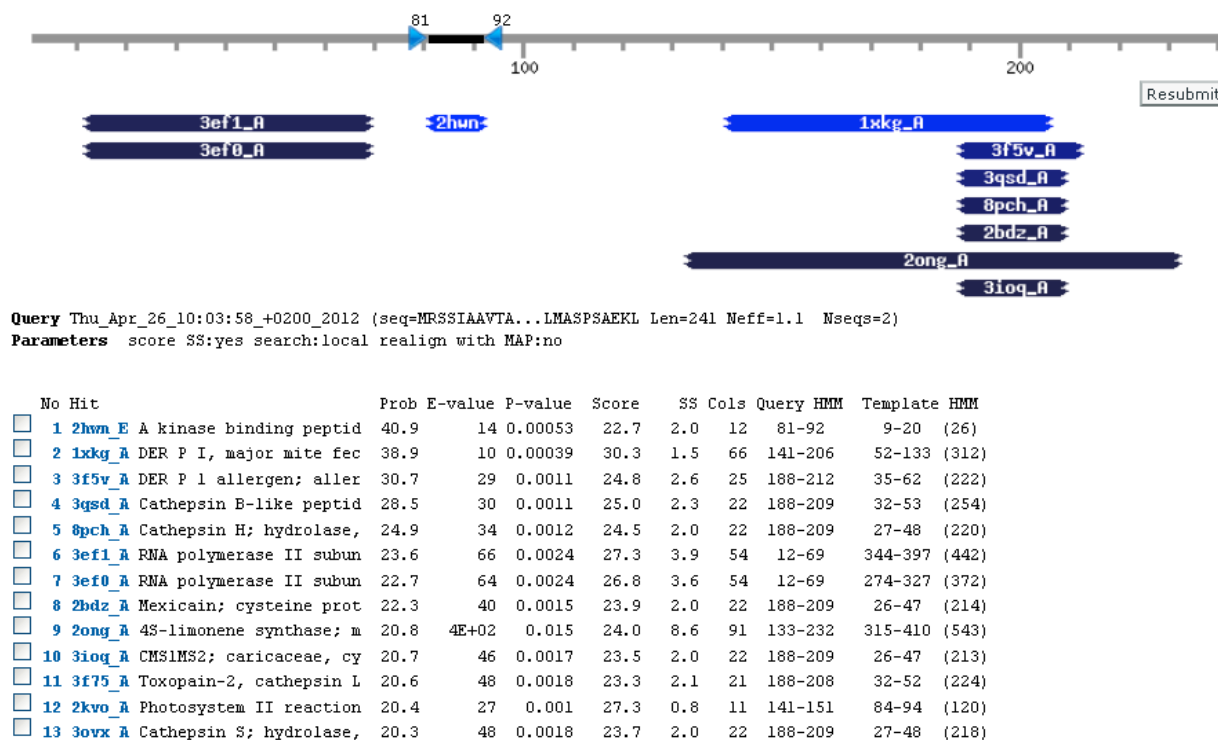
Obrázek 19

Přítomnost peptidázy X v buňkách *Spirotrunculus vortens*. Vlevo Nomarskiho diferenciální kontrast, vpravo - modře DAPI – jaderné barvení, červeně peptidáza X

5.7. Funkce peptidázy X

5.7.1. Hledání strukturní podobnosti

Pro odhalení skryté homologie peptidázy X se známými proteiny byl využit bioinformatický nástroj HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/sections/search>) za přednastavených parametrů. Tento přístup je založen na vzájemném porovnání tzv. hidden Markovových modelů (HMM), což v některých případech může výrazně zvýšit citlivost rozeznání homologní oblasti v sekvenci proteinu. HHpred detekoval přítomnost motivu společného pro cysteinové proteázy z papainové rodiny (**Obrázek 20 a 21**). Cysteinové peptidázy obsahují v aktivním místě, nebo v jeho těsné blízkosti, cystein a histidin (Sajid and H McKerrow, 2002). Pokud se cystein nenachází v aktivním místě, ani v jeho blízkosti, protein není aktivní (Jílková et al., 2011).



Obrázek 20

Peptidáza X sdílí motiv s cysteinovými proteázami z papainové rodiny (jako je toxopain, cruzipain, falcipain) ale i například fekální alergen z *Dermatophagoides*.

<i>Giardia intestinalis</i>	185	VATWAFASAAAGE	197
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	112	GSAWAFSGVAATE	124
<i>Schistosoma mansoni</i>	98	GSCWAFGAVEAMS	110
<i>Toxoplasma gondii</i>	29	GSCWAFSTTGALE	41
<i>Trypanosoma cruzi</i>	23	GSCWAFSAIGNVE	35

Obrázek 21

Nalezený proteinový úsek společný pro peptidázu X a zástupce papainové rodiny cysteinových proteáz.

5.7.2. Testování aktivity IMP dehydrogenázy

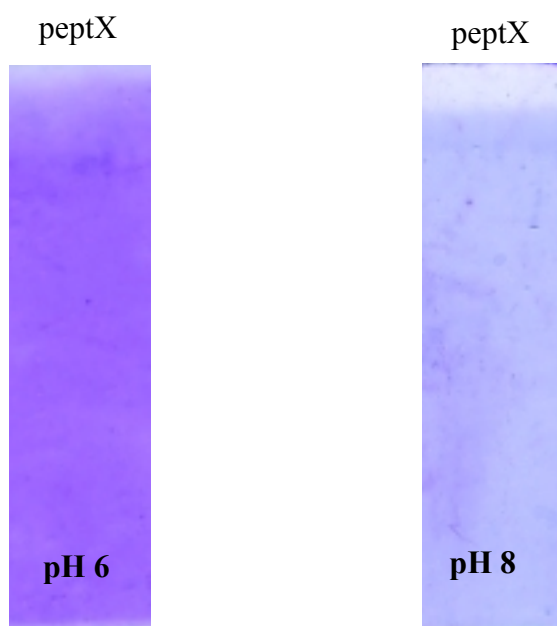
Pomocí WU-Blastu (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/>) se podařilo odhalit vzdálenou podobnost peptidázy X s proteinem *Burkholderia pseudomallei*. Přístupové číslo sekvence tohoto proteinu je GBP346_B0244 a jedná se o IMP dehydrogenázu.

IMP-dehydrogenáza (Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase) kontroluje velikost guaninových nukleotidů, které jsou nezbytné pro funkci mnoha fyziologických procesů včetně replikace, transkripce, signalizace a glykosylace (Weber et al., 1992).

Na vzorcích buněčných lyzátů získaných z bakterií exprimující rekombinantní peptidázu jsme se pokusili stanovit aktivitu IMP dehydrogenázy. Jako kontrola byl použit lyzát z neindukovaných bakterií. Bohužel žádná aktivita detekována nebyla.

5.7.3. Proteázová aktivita peptidázy X

Pro detekci proteázové aktivity proteinu byla peptidáza X vypurifikována za nativních podmínek a testována na gelatinové elektroforéze. Jako kontrola posloužila cysteinová proteáza trypsin (výsledky nejsou ukázány). Jelikož je aktivace proteinů závislá na pH, byla aktivita peptidázy X testována při pH 6 a pH 8 (**Obrázek 22**). Nebyla však zaznamenána žádná aktivita peptidázy X.



Obrázek 22

Pro zjištění aktivity byla použita gelatinová elektroforéza. Nativně vypurifikovaný protein nevykazoval aktivitu, jako kontrolní vzorek byl použit trypsin.

5.7.4. Procesující aktivita

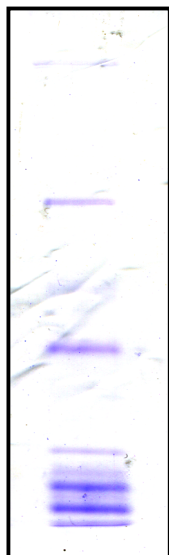
Jediným vodítkem pro zjištění aktivity peptidázy X nám byl výsledek HHpred analýzy. Jedná se o minimální podobnost, ale přesto jsme se pokusili identifikovat možnou proteázovou aktivitu proteinu. Membránová lokalizace peptidázy X nás vedla k hypotéze, že by se mohlo jednat o specifický typ procesující peptidázy.

Rozhodli jsme se otestovat specifickou aktivitu proteinu vůči konkrétnímu mitosomálnímu proteinu. Testovali jsme účinek peptidázy X na mitosomální glutaredoxin 5, neboť se u něj objevuje neobvyklé procesování N-terminální sekvence (Rada et al., 2009). Tato sekvence je mimořádně hydrofóbní a není odštěpena „klasickou“ procesující peptidázou. Inkubací nativně purifikované peptidázy X s glutaredoxinem 5 jsme sledovali možné štěpení substrátu, tzv. cleavage assay.

Glutaredoxin (Grx5) giardie je příbuzný mitochondriálnímu monothiolovému glutaredoxinu, který je zapojen do syntézy Fe-S klastrů (Jedelský et al., 2011). V genomu giardie je Grx5 o velikosti 22 kDa, v mitosomu se však nachází pouze o velikosti 14 kDa.

Pro získání většího množství proteinu byl do buněk BL21 vložen expresní plazmid s kompletním genem pro Grx5. Pro lepší expresi proteinu bylo dle rady Jany Pyriha postupováno za speciálních podmínek (viz materiál a metodika 4.13.1.2). Exprimovaný protein byl poté purifikován za denaturačních podmínek na niklové koloně. Byla provedena SDS Page, vzorek byl zahuštěn, přebílotován a otestován protilátkou α -Grx5 (**Obrázek 23**). Denaturované polypeptidy jsou používány jako substráty pro procesující peptidázy. Abychom zjistili, zda se peptidáza X nějakým způsobem podílí na procesování Grx5, byla exprimována v buňkách BL21 a purifikována za nativních podmínek (**Obrázek 24**). Získaný protein byl zahuštěn a ihned byla provedena samotná cleavage assay (viz materiál a metody). Negativní výsledek pokusu znázorňuje **obrázek 25**.

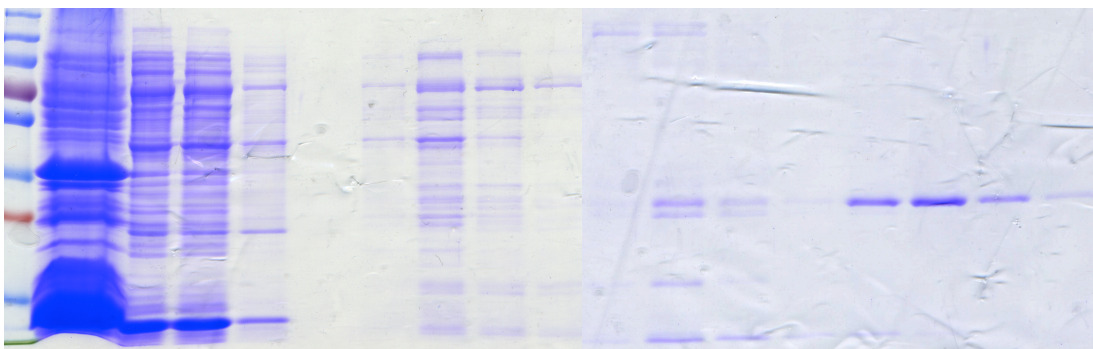
25kDa



Obrázek 23

Purifikovaný Grx5 o velikosti 25kDa

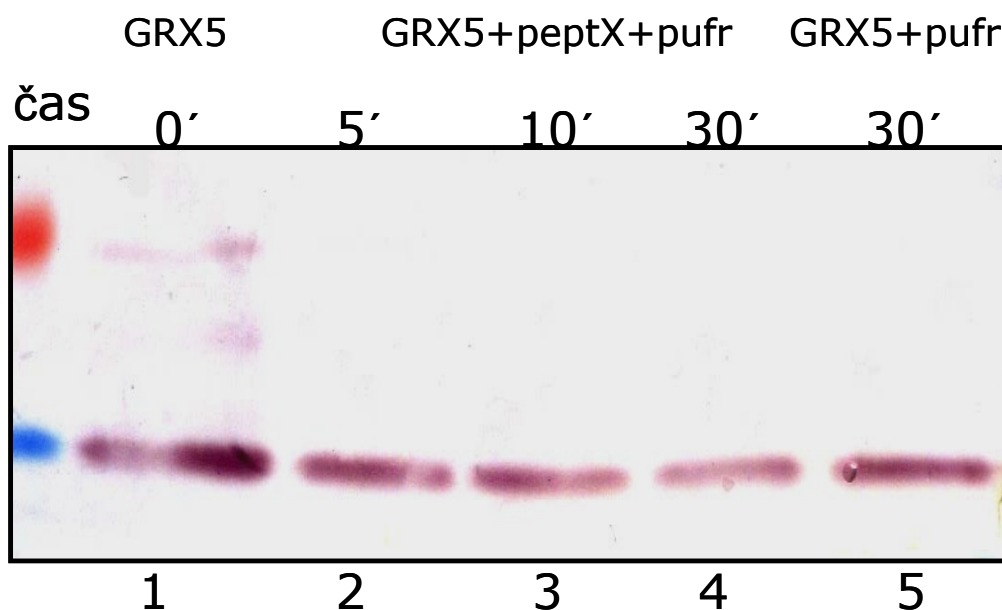
L P S FT W1 W2 D1 D2 D3 D4 E1 E2 E3 E4 F1 F2 F3 F4



Obrázek 24

Purifikace peptidázy X za nativních podmínek.

L-ladder, P-pelet, S-supernatant, FT-flowthrough, W1-wash1, W2-wash2, D1-D4-promývání 50mM imidazolem, E1-E4- 100mM imidazol, F1-F4 250mM imidazol.



Obrázek 25

Cleavage assay

Vzorek 1 – 20μl GRX5; vzorky 2 až 4 – 40μl peptidázy X+20μl GRX5+40μl pufru, tyto vzorky inkubovány při teplotě 37°C v časech 5,10 a 30 minut; vzorek 5 – 20 μl GRX5 + 80 μl pufru, inkubováno při teplotě 37°C po dobu 30 minut. Peptidáza X nevykazuje žádnou aktivitu vůči Grx5.

6. Diskuze

Na základě proteomické analýzy (Jedelský et al., 2011) bylo identifikováno několik neznámých proteinů s mitosomální lokalizací. Tyto proteiny nejsou homologní s dosud žádnými charakterizovanými zástupci a zřejmě proto představují unikátní giardiové molekuly.

Zjišťování funkce unikátního proteinu je poměrně složitý experimentální proces, který je nejčastěji řešen umlčováním exprese zodpovědného genu a sledováním navozeného fenotypu. Takový přístup však není pro experimentální práci s *G. intestinalis* rutinně k dispozici.

Význam této práce proto spočíval v charakterizaci jednoho z unikátních mitosomálních proteinů, zde nazvaného jako peptidáza X. Přítomnost naprosto neznámého proteinu v extrémně redukovaných mitochondriích *G. intestinalis*, u kterých došlo k zavržení naprosté většiny mitochondriálních funkcí, předpokládá jeho nezbytnou a zároveň jedinečnou funkci. Charakterizace peptidázy X proto slouží jako modelový případ identifikace funkce dosud neznámého proteinu. Na důležitosti tento projekt nabyl ve světle nedávných výsledků, které vyvrátily původně zjištěnou mitosomální lokalizaci proteinů VAP (Jedelský et al., 2011) a Sec20 (Elias et al., 2008).

Protilátka specifická na VAP protein však ukázala jeho naprosto odlišnou lokalizaci, zřejmě se nachází v jaderné membráně (Eva Martincová, ústní sdělení), toto může být způsobeno episomální expresí proteinu. Stejně tak i mitosomální lokalizace Sec20 (Elias et al., 2008) je zřejmě rovněž experimentálním artefaktem (Luboš Voleman, připraveno k publikaci).

Pro potvrzení mitosomální lokalizace peptidázy X byla proto vytvořena specifická polyklonální protilátka, která na western blotu i během imunofluorescence potvrdila výhradně mitosomální lokalizaci proteinu. Navíc se jedná o velmi specifickou a citlivou protilátku, která slouží ostatním členům laboratoře jako kontrola pro mitosomální kompartment. Získání takto kvalitní protilátky nám umožnilo další charakterizaci proteinu.

- (i) Odhad velikosti procesované molekuly peptidázy X na buněčných frakcích (25kDa) nám umožnil nepřímo naznačit možné místo odštěpení mitosomální targetovací sekvence, které zároveň ukazuje na chybnou predikci procesování pomocí PSORT II. Skutečné místo štěpení je však schopna odhalit pouze přímá sekvenace imunoprecipitovaného proteinu.
- (ii) Metodou nepřímé imunofluorescence byla ověřena specifická přítomnost peptidázy X v mitosomech giardie, kde byla jasně patrná kolokalizace signálů peptidázy X s mitosomálním markerem IscU.

- (iii) Imunozačením vzorků získaných metodou extrakce uhličitanem sodným bylo potvrzeno membránové zakotvení proteinu. Protein zůstal i po extrakci ve frakci obsahující další membránové proteiny (Tom40, Sec20).

Protilátka bude v budoucnu využita pro analýzu případného membránového komplexu, jehož by mohla být peptidáza X součástí. Budeme detekovat přítomnost proteinového komplexu na nativní modré elektroforéze. Pokusíme se i imunoprecipitovat peptidázu X za účelem charakterizace proteinových partnerů i pro přesnou identifikaci místa odštěpení targetovací sekvence.

Jak jsme prokázali expresi v heterologním systému kvasinky *S. cerevisiae*, tato targetovací sekvence je rozpoznána i mitochondriálními translokázami a zajišťuje transport proteinu do organely. Tento pokus potvrdil obecnou podobnost mitosomálních a mitochondriálních presekvenčí, které jsou ve většině případů volně zaměnitelné (Doležal et al., 2005; Šmíd et al., 2008).

Expresí peptidázy X v *S. cerevisiae* nám také umožnila sledovat možný vliv přítomnosti proteinu na růst kvasinek, a to za účelem odhadnutí možné aktivity peptidázy X. Při testování růstu kvasinek v ředících řadách na různých půdách a teplotách však nebyl odhalen žádný růstový defekt (tyto výsledky nejsou prezentovány).

Pro charakterizaci funkce peptidázy X jsme proto zvolili bioinformatický přístup. Bioinformatický nástroj HHpred, který je založen na vzájemném porovnání tzv. hidden Markovových modelů, identifikoval v proteinové sekvenci peptidázy X motiv společný pro cysteinové proteázy z papainové rodiny. Některé další nalezené homologie, však nebyly brány v potaz, jelikož jejich mitosomální lokalizace nepřichází v úvahu, jako je tomu například u detekované homologie s RNA polymerázou II. Pokusy s nativně purifikovanou peptidázou X však neprokázaly přítomnost specifické aktivity na gelatinové elektroforéze. Proto jsme se rozhodli otestovat sekvenčně specifickou peptidázovou aktivitu na mitosomálním substrátu. Nedávno charakterizovaný mitosomální glutaredoxin (Rada et al., 2009) totiž nese na svém N-konci poměrně dlouhou hydrofóbní sekvenci, která není přítomna v procesovaném proteinu. Přesto je nezbytná pro import glutaredoxinu do organely (Rada et al., 2009). Za předpokladu, že klasická mitochondriální/mitosomální procesující peptidáza není schopna odštěpit hydrofóbní presekvenčí (Šmíd et al., 2008) a peptidáza X je membránově ukotvený protein, rozhodli jsme se otestovat možnou proteolytickou aktivitu peptidázy X přímo na purifikovaném mitosomálním glutaredoxinu. Předběžný experiment

však tuto aktivitu nepotvrdil, ale pro konečné odmítnutí této hypotézy je nutno tyto pokusy zopakovat.

Pomocí WU-Blastu byla nalezena vzdálená homologie k IMP dehydrogenáze z *Burkholderia pseudomallei*. Ani v tomo případě však nedošlo ke stanovení enzymatické aktivity nativně purifikovaného proteinu.

7. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se pokusila charakterizovat neznámý protein, který jsme identifikovali v extrémně redukovaných mitochondriích, mitosomech, lidského patogena *Giardia instestinalis*. Proteom těchto organel je v současnosti reprezentován méně než dvaceti proteiny, které jsou importovány z cytoplasmy, kompletně totiž chybí mitochondriální genom. N-koncové sekvence, které zacilují tyto proteiny do mitochondrií, jsou uvnitř organel odštěpeny specifickými peptidázami a zbylý protein tak může nabýt nativní konformace. Pomocí specifické protilátky jsme ověřili mitosomální lokalizaci proteinu a charakterizovali přesnou distribuci proteinu do mitosomálních subkompartmentů. Bohužel jsme nebyli schopni odhalit možnou aktivitu peptidázy X na rekombinantním proteinu. Pro tento cíl proto bude zřejmě třeba práce s přirozeným endogenním proteinem.

8. Seznam použité literatury

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical microbiology reviews* 14, 447–475.
- Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia* spp. *Microbiological reviews* 55, 706–732.
- Amini, F. (1963). Giardiasis and steatorrhoea. *The Journal of tropical medicine and hygiene* 66, 190–192.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., and Svärd, S. G. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature reviews. Microbiology* 8, 413–422.
- Antia, F. P., Desai, H. G., Jeejeebhoy, K. N., Kane, M. P., and Borkar, A. V. (1966). Giardiasis in adults. Incidence symptomatology and absorption studies. *Indian journal of medical sciences* 20, 471–477.
- Bradley, P. J., Lahti, C. J., Plümper, E., and Johnson, P. J. (1997). Targeting and translocation of proteins into the hydrogenosome of the protist *Trichomonas*: similarities with mitochondrial protein import. *The EMBO journal* 16, 3484–3493.
- Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., Bödicker, M., and Schmitz, U. K. (1995). The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc₁-complex of the respiratory chain. *Planta* 195, 396–402.
- Bruggen, J. J. A. V., Zwart, K. B., Stumm, C. K., and Vogels, G. D. (1984). *Microbiology* 9, 1–7.
- Bui, E. T. N. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9651–9656.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628–644.
- Craun, G. F. (1986). Waterborne giardiasis in the United States 1965–84. *Lancet* 2, 513–514.
- Dagley, M. J., Dolezal, P., Likic, V. A., Smid, O., Purcell, A. W., Buchanan, S. K., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2009). The protein import channel in the outer mitochondrial membrane of *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution* 26, 1941–1947.
- Daum, G., Gasser, S. M., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b₂ by isolated yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 257, 13075–13080.
- Dietmeier, K., Hönliger, A., Bömer, U., Dekker, P. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M., and Pfanner, N. (1997). Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 388, 195–200.
- Doležal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubáková, Z., Bursác, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T., and Tachezy, J. (2005). *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a

common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10924–10929.

Elias, E. V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T. E., Neiman, A., and Lujan, H. D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry* 283, 35996–36010.

Embley, T. M., and Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440, 623–630.

Fenchel, T., and J Finlay, B. (1991). Endosymbiotic Methanogenic Bacteria In Anaerobic Ciliates - Significance For The Growth Efficiency Of The Host. *Journal Of Protozoology* 38.

Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta* 1592, 63–77.

van der Giezen, M., and Tovar, J. (2005). Degenerate mitochondria. *EMBO reports* 6, 525–530.

Haucke, V., Ocana, C. S., Hönlinger, A., Tokatlidis, K., Pfanner, N., and Schatz, G. (1997). Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b5 reductase to two locations within yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology* 17, 4024–4032.

Herrmann, J. M., and Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Current opinion in microbiology* 3, 210–214.

Hill, K., Model, K., Ryan, M. T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., and Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516–521.

Honigberg, B. M., Volkmann, D., Entzeroth, R., and Scholtyseck, E. (1984). A freeze-fracture electron microscope study of *Trichomonas vaginalis* Donné and *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *The Journal of protozoology* 31, 116–131.

Hoppins, S. C., and Nargang, F. E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *The Journal of biological chemistry* 279, 12396–12405.

Hsu, B.-M., Wun, H.-Y., and Hsu, P.-C. (2007). Prevalence and genotyping of *Giardia* in husbandry systems in Taiwan. *Parasitology research* 101, 275–280.

Jan, P. S., Esser, K., Pratje, E., and Michaelis, G. (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2. *Molecular & general genetics* : MGG 263, 483–491.

Jedelský, P. L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Smíd, O., Hrdý, I., Sedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A. J., et al. (2011). The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PloS one* 6, e17285.

Jílková, A., Rezáčová, P., Lepsík, M., Horn, M., Váchová, J., Fanfrlík, J., Brynda, J., McKerrow, J. H., Caffrey, C. R., and Mares, M. (2011). Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of biological chemistry* 286, 35770–35781.

Kalousek, F., Isaya, G., and Rosenberg, L. E. (1992). Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *The EMBO journal* 11, 2803–2809.

Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 487–488.

Koehler, C. M., Merchant, S., and Schatz, G. (1999). How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends in biochemical sciences* 24, 428–432.

Konrad, C., Spycher, C., and Hehl, A. B. (2010). Selective condensation drives partitioning and sequential secretion of cyst wall proteins in differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS pathogens* 6, e1000835.

Kovermann, P., Truscott, K. N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N. B., Müller, H., Jensen, R. E., Wagner, R., and Pfanner, N. (2002). Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Molecular cell* 9, 363–373.

Kutik, S., Rissler, M., Guan, X. L., Guiard, B., Shui, G., Gebert, N., Heacock, P. N., Rehling, P., Dowhan, W., Wenk, M. R., et al. (2008). The translocator maintenance protein Tam41 is required for mitochondrial cardiolipin biosynthesis. *The Journal of cell biology* 183, 1213–1221.

Künkele, K. P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F. E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., and Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009–1019.

Lahti, C. J., d' Oliveira, C. E., and Johnson, P. J. (1992). Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of bacteriology* 174, 6822–6830.

Lloyd, D., Hillman, K., Yarlett, N., and Williams, A. G. Hydrogen production by rumen holotrich protozoa: effects of oxygen and implications for metabolic control by in situ conditions. *The Journal of protozoology* 36, 205–213.

Luciano, P., and Géli, V. (1996). The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* 52, 1077–1082.

Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle (“crypton”) in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and cellular biology* 19, 2198–2205.

Matouschek, A., Pfanner, N., and Voos, W. (2000). Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO reports* 1, 404–410.

Meyers, J. D., Kuharic, H. A., and Holmes, K. K. (1977). *Giardia lamblia* infection in homosexual men. *The British journal of venereal diseases* 53, 54–55.

Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K. N., Pfanner, N., and Ryan, M. T. (2001). Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nature structural biology* 8, 361–370.

Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic acids research* 22, 5767–5768.

Neupert, W., and Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 555–565.

Newmeyer, D. D., and Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481–490.

Nunnari, J., Fox, T. D., and Walter, P. (1993). A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science (New York, N.Y.)* 262, 1997–2004.

O’Fallon, J. V., Wright, R. W., and Calza, R. E. (1991). Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *The Biochemical journal* 274 (Pt 2, 595–599.

P Cormack, B., Bertram, G., Egerton, M., A Gow, N., Falkow, S., and J Brown, A. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2, 303–311.

Paltauf, F., and Meingassner, J. G. (1982). The absence of cardiolipin in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of parasitology* 68, 949–950.

Paul, R. G., Williams, A. G., and Butler, R. D. (1990). Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Journal of general microbiology* 136, 1981–1989.

Peattie, D. A., Alonso, R. A., Hein, A., and Caulfield, J. P. (1989). Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *The Journal of cell biology* 109, 2323–2335.

Petersen, L. R., Cartter, M. L., and Hadler, J. L. (1988). A food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *The Journal of infectious diseases* 157, 846–848.

Pfanner, N., and Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 339–349.

Rada, P., Smíd, O., Sutak, R., Dolezal, P., Pyrih, J., Zársky, V., Montagne, J.-J., Hrdy, I., Camadro, J.-M., and Tachezy, J. (2009). The monothiol single-domain glutaredoxin is conserved in the highly reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic cell* 8, 1584–1591.

Reiner, D. S., McCaffery, M., and Gillin, F. D. (1990). Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *European journal of cell biology* 53, 142–153.

Roise, D., and Schatz, G. (1988). Mitochondrial presequences. *The Journal of biological chemistry* 263, 4509–4511.

Sajid, M., and McKerrow, J. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 1–21.

Schatz, G., and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science (New York, N.Y.)* 271, 1519–1526.

Schneider, A., Oppliger, W., and Jenö, P. (1994). Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer. *The Journal of biological chemistry* 269, 8635–8638.

Schwartz, R. M., and Dayhoff, M. O. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science (New York, N.Y.)* 199, 395–403.

Sirrenberg, C., Bauer, M. F., Guiard, B., Neupert, W., and Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384, 582–585.

Šmíd, O., Matusková, A., Harris, S. R., Kucera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutejová, E., Hirt, R. P., Embley, T. M., et al. (2008). Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *trichomonas vaginalis* and *giardia intestinalis*. *PLoS pathogens* 4, e1000243.

Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A., and Deisenhofer, J. (2001). Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure (London, England : 1993)* 9, 615–625.

Tewari, S. G., and Tandon, B. N. (1974). Functional and histological changes of small bowel in patients with *giardia lamblia* infestation. *The Indian journal of medical research* 62, 689–695.

Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C. G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular microbiology* 32, 1013–1021.

Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L. B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., and Lucocq, J. M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172–176.

Truscott, K. N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A. J., Rassow, J., Pfanner, N., and Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nature structural biology* 8, 1074–1082.

Vassarotti, A., Stroud, R., and Douglas, M. (1987). Independent mutations at the amino terminus of a protein act as surrogate signals for mitochondrial import. *The EMBO journal* 6, 705–711.

Veghelyi, P. V. (1940). GIARDIASIS. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 59, 793–804.

Weber, G., Nakamura, H., Natsumeda, Y., Szekeres, T., and Nagai, M. (1992). Regulation of GTP biosynthesis. *Advances in enzyme regulation* 32, 57–69.

Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 279, 14473–14476.

Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M., and Embley, T. M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418, 865–869.

Yang, M. J., Geli, V., Oppliger, W., Suda, K., James, P., and Schatz, G. (1991). The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein. *The Journal of biological chemistry* 266, 6416–6423.

Yarlett, N., Hann, A. C., Lloyd, D., and Williams, A. (1981). Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *The Biochemical journal* 200, 365–372.

Yarlett, N., Orpin, C. G., Munn, E. A., Yarlett, N. C., and Greenwood, C. A. (1986). Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *The Biochemical journal* 236, 729–739.